

Búsqueda de tratamientos para la Neurodegeneración con Acumulación Cerebral de Hierro



Tesis Doctoral
Mónica Álvarez Córdoba
Sevilla, 2019



BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS PARA LA NEURODEGENERACIÓN CON ACUMULACIÓN CEREBRAL DE HIERRO

TESIS DOCTORAL

**MÓNICA ÁLVAREZ CÓRDOBA
SEVILLA, 2019**





BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS PARA LA NEURODEGENERACIÓN CON ACUMULACIÓN CEREBRAL DE HIERRO

TESIS DOCTORAL

Memoria de tesis doctoral presentada por MÓNICA ÁLVAREZ CÓRDOBA, licenciada en Biología, para optar al título de Doctor enmarcado en el programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química. Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC-UPO-JA) y financiada por la Asociación Española de Pacientes afectados por Enfermedades Neurodegenerativas con Acumulación Cerebral de Hierro (ENACH) desde el año 2015 hasta la actualidad. Esta tesis está inscrita al Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide.

Mónica Álvarez Córdoba, Sevilla 2019





EL DIRECTOR

José Antonio Sánchez Alcázar

Catedrático de la Universidad Pablo de Olavide

D. JOSÉ ANTONIO SÁNCHEZ ALCÁZAR, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid y Catedrático del área de Biología Celular en el departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

INFORMA

Que **DÑA. MÓNICA ÁLVAREZ CÓRDOBA**, licenciada en Biología por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada **BÚSQUEDA DE TRATAMIENTOS PARA LA NEURODEGENERACIÓN CON ACUMULACIÓN CEREBRAL DE HIERRO** y que a su juicio reúne los méritos suficientes para superar el programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 12 de diciembre de 2019

Fdo.: José Antonio Sánchez Alcázar

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del programa de Doctorado en Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química, en el Grupo de Investigación de Fisiopatología Celular en la Enfermedad y el Desarrollo del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide y bajo la dirección del Dr. José Antonio Sánchez Alcázar gracias a la financiación del proyecto de investigación en salud PI13/00129 del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad, y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER-Unión Europea). El trabajo del doctorando ha sido financiado por la Universidad Pablo de Olavide y por la asociación ENACH.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es un técnico de laboratorio. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

A mi madre.

ABSTRACT

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) is a group of inherited neurologic disorders in which iron accumulates in the basal ganglia resulting in progressive dystonia, spasticity, parkinsonism, neuropsychiatric abnormalities, and optic atrophy or retinal degeneration. The most prevalent form of NBIA is pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN) associated with mutations in the gene of pantothenate kinase 2 (PANK2), which is essential for coenzyme A (CoA) synthesis. There is no cure for NBIA nor is there a standard course of treatment. In the current work, we describe that fibroblasts derived from patients harbouring PANK2 mutations can reproduce many of the cellular pathological alterations found in the disease, such as intracellular iron and lipofuscin accumulation, increased oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. Furthermore, mutant fibroblasts showed a characteristic senescent morphology. Treatment with pantothenate, the PANK2 enzyme substrate, was able to correct all pathological alterations in responder mutant fibroblasts with residual PANK2 enzyme expression. However, pantothenate had no effect on mutant fibroblasts with truncated/incomplete protein expression. The positive effect of pantothenate in particular mutations was also confirmed in induced neurons obtained by direct reprogramming of mutant fibroblasts. Our results suggest that pantothenate treatment can stabilize the expression levels of PANK2 in selected mutations. These results encourage us to propose our screening model as a quick and easy way to detect pantothenate-responder patients with PANK2 mutations. The existence of residual enzyme expression in some affected individuals raises the possibility of treatment using high dose of pantothenate.

RESUMEN

La neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NACH) es un grupo de trastornos neurológicos hereditarios en los que el hierro se acumula en los ganglios basales y produce distonía progresiva, espasticidad, parkinsonismo, anomalías neuropsiquiátricas y atrofia óptica o degeneración retiniana. La forma más frecuente de NACH es la neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa (PKAN) asociada con mutaciones en el gen de pantotenato quinasa 2 (PANK2), que es esencial para la síntesis de coenzima A (CoA). No hay cura para las NACH ni hay un tratamiento estándar. En la presente Tesis, describimos que los fibroblastos derivados de pacientes que albergan mutaciones en PANK2 pueden reproducir muchas de las alteraciones patológicas celulares que se encuentran en la enfermedad, como la acumulación intracelular de hierro y lipofusina, el aumento del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y una morfología senescente característica. El tratamiento con pantotenato, el sustrato enzimático PANK2, fue capaz de corregir todas las alteraciones patológicas en los fibroblastos mutantes respondedores con expresión residual de la enzima PANK2. Sin embargo, el pantotenato no tuvo efecto sobre los fibroblastos mutantes con expresión de la proteína truncada/ incompleta. El efecto positivo del pantotenato en mutaciones particulares también se confirmó en neuronas inducidas obtenidas por reprogramación directa de los fibroblastos mutantes. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con pantotenato puede estabilizar los niveles de expresión de la PANK2 en mutaciones seleccionadas. Estos resultados nos animan a proponer nuestro modelo de detección como una forma rápida y fácil de detectar pacientes con mutaciones PANK2 respondedores a pantotenato. La existencia de pacientes con una expresión residual del enzima PANK2 posibilita el tratamiento con altas dosis de pantotenato.

INDICE

ABREVIATURAS.....	25
--------------------------	-----------

INTRODUCCIÓN.....	33
--------------------------	-----------

EL HIERRO COMO ELEMENTO ESENCIAL DE LOS SERES VIVOS	35
METABOLISMO DEL HIERRO SISTÉMICO.....	38
ENTRADA DEL HIERRO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	41
METABOLISMO DEL HIERRO EN EL CEREBRO.....	44
ACUMULACIÓN DE HIERRO EN EL CEREBRO	47
ENFERMEDADES QUE PRESENTAN ACUMULACIÓN CEREBRAL DE HIERRO	49
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	50
ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	51
ATAXIA DE FRIEDREICH.....	52
ENFERMEDAD DE HUNTIGTON	52
NACH.....	54
HERENCIA Y GENES CAUSANTES DE LA ENFERMEDAD	54
TIPOS DE ENACH.....	61
Neurodegeneración asociada a PLA2G6 (PLAN), NACH tipo 2.....	61
Aceruloplasminemia	62
Neuroferritinopatía	62
Neurodegeneración asociada a FA2H (FA2HN/SPG35)	63
Enfermedad de Kufor-Rakeb	63
Neurodegeneración asociada a proteínas de la membrana mitocondrial (MPAN)	64
Síndrome Woodhouse-Sakati	64
Neurodegeneración asociada a la proteína β -propeller (BPAN).....	65
Neurodegeneración asociada a CoA sintetasa (CoPAN)	65
Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora	65
Neurodegeneración asociada a CRAT	66
Neurodegeneración asociada a AP4M1	66
Neurodegeneración asociada a REPS1	66
Neurodegeneración asociada a GTPBP2.....	66
NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A PANTOTENATO QUINASA (PKAN)....	69
Clasificación y síntomas de PKAN.....	71
PKAN clásica	71
PKAN atípica	71

Diagnóstico	72
Tratamiento.....	77
Mecanismos moleculares implicados en la patología	78
Coenzima A	79
La ruta biosintética del coenzima A	80
Relación del CoA con las PANK.....	84
Disminución de los niveles de Coenzima A.....	86
Acetilación del CoA.....	88
Relación entre acetilación y CoA	89
Relación entre neurodegeneración y la disminución de la acetilación de histonas y tubulinas.....	90
CoA y Autofagia	91
Modelos animales en PANK	92
<i>Drosophila melanogaster</i>	92
<i>Mus musculus</i>	93
REPROGRAMACIÓN DIRECTA.....	94
REPROGRAMACIÓN NEURONAL DIRECTA	97
VENTAJAS Y DESVENTAJAS.....	100
APLICACIONES DE LA REPROGRAMACIÓN DIRECTA	101

OBJETIVOS..... 103

MATERIALES Y MÉTODOS 109

M.1. REACTIVOS	111
M.2. DECLARACIÓN ÉTICA.....	112
M.3. CULTIVOS CELULARES	112
M.4. MORFOLOGÍA CELULAR	113
M.5. TRATAMIENTOS	113
M.6. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO POR LA TINCIÓN AZUL DE PRUSIA.	113
M.7. DETERMINACIÓN DE HIERRO POR EL ENSAYO DE LA FERROZINA... ..	114
M.8. DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ESPECTOFOTOMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS).	114

M.9. DETERMINACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LIPOFUSCINA POR LA TINCIÓN NEGRO SUDÁN.	115
M.10. PURIFICACIÓN DE LOS GRANULOS DE LIPOFUSCINA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA CON ESPECTOFOTOMETRÍA DE RAYOS (SEM/EDX)	116
M.11. ENSAYO DE INMUNOTINCIÓN/ WESTERN BLOT	117
M.12. MICROSCOPIA DE INMUNOTINCIÓN	118
M.13. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	119
M.14. MUERTE CELULAR EN CÉLULAS PKAN CON ROTENONA Y CLORURO DE HIERRO	119
M.15. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DEL HIERRO (LIP-CALCEINA)	120
M.16. ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN MITOCONDRIAL: MITOPEDPP	120
M.17. DETERMINACIÓN DEL GRUPO HEMO	121
M.18. EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CARBONILADAS POR WESTERN BLOT	122
M.19. FRACCIONAMIENTO CELULAR Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES	123
M.20. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoA POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)	123
M.21. ANÁLISIS DE LA RED MITOCONDRIAL	124
M.22. BIOENERGÉTICA Y ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE EL ANALIZADOR SEAHORSE	125
M.23. ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL ENSAYO CON EL ANALIZADOR SEAHORSE	125
M.24. GENERACIÓN DE NEURONAS INDUCIDAS DESDE FIBROBLASTOS POR REPROGRAMACIÓN DIRECTA	126
M.25. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	127
RESULTADOS	129

R.2. LOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES PKAN MUESTRAN ALTERACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR, ACUMULACIÓN DE HIERRO Y LIPOFUSCINA ...	132
R.3. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO RESTAURA LA MORFOLOGÍA CELULAR Y REDUCCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO / LIPOFUSCINA EN LOS FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PACIENTES PKAN SEGÚN EL TIPO DE MUTACIÓN PANK2	142
R.4. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO PREVIENE LA CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS Y LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA MITOCONDRIAL EN FIBROBLASTOS PKAN RESPONDEDORES	150
R.5. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO RESTAURA LA BIOENERGÉTICA CELULAR Y LAS ALTERACIONES DE LA RED MITOCONDRIAL EN LOS FIBROBLASTOS PKAN RESPONDEDORES	154
R.6. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO PROTEGE A LOS FIBROBLASTOS RESPONDEDORES DE LA MUERTE INDUCIDA	159
R.7. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO ESTABILIZA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS FIBROBLASTOS PKAN	160
R.8. EL TRATAMIENTO CON PANTOTENATO CORRIGE EL METABOLISMO DEL HIERRO EN LOS FIBROBLASTOS PKAN RESPONDEDORES	161
R.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS INDUCIDAS POR REPROGRAMACIÓN DIRECTA A PARTIR DE LOS FIBROBLASTOS CONTROL Y FIBROBLASTOS PKAN. EVALUACIÓN DE COMPUESTOS POSITIVOS EN LAS CÉLULAS NEURONALES, Y ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE HIERRO EN NEURONAS CONTROL Y NEURONAS PKAN.....	164
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES.....	189
REFERENCIAS.....	193

APÉNDICE.....	223
A.1. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	225
FIGURAS.....	225
TABLAS	230
A.2. AGRADECIMIENTOS	231

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

AMP: Adenosin-Monofostato

AMPK: activador de proteina kinasa 5'-adenosina monofosfato

APS: Persulfato de amonio

ARNm: Acido ribonucleico mensajero **ASCL1:** Achaete-scute complejo 1

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosin-Trifosfato

ATP13A2: ATPasa transporte de cationes 13-A2. Gen causante enfermedad de Kufor-Rakeb

BBB: Barrera hematoencefalica

BPAN: Neurodegeneración asociada a la proteína beta- hélices

BRN2: Factor de transcripción cerebral 2

C19orf12: Cromosoma 19 marco abierto de lectura 12. Gen causante enfermedad MPAN

CaMKII: Protein quinasa II, dependiente de calcio

CF: Chaperona farmacéuticas

CNS: Central Nervous System (siglas en ingles del Sistema Nervioso Central)

CoA: Coenzima A

COASY: Coenzima A sintetasa

CoPAN: Neurodegeneración asociada a proteína CoASY

Cp: Ceruloplasmina

Cys: Cisteina

DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilindol

db- cAMP: Dibutirill-ciclico AMP

DBS: Deep Brain Stimulation (siglas en ingles de Estimulación craneal profunda)

DCAF17: DDB1 y CUL4 Factor asociado 17. Gen causante de la enfermedad Síndrome Woodhouse-Sakati

DE: Desviación estándar

Def: Deferiprona

DLXs: Distal less proteínas

DLXs: Distal-less homeobox proteínas (1,2 y 5)

DMEM: Medio Dulbecco's Eagle's

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DMT1: Transportador divalente de metal 1

DP-CoA: Defosfo-CoA

DPCK: Defosfo-CoA quinasa

DPCK: Defosfo-CoA quinasa

DPI: Días post-infección

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

ENACH: Enfermedades Neurodegenerativas con Acumulación Cerebral de Hierro

EP300: Histona acetiltransferasa p300

FA2H: Ácido graso hidroxilasa 2

FAHN: Neurodegeneración asociada a ácidos grasos hidroxilasa

Fbl: Fumble, gen homólogo PANK2 en *Drosophila melanogaster*

FBS/BSA: Suero fetal bovino

FBXL5E3: F-box y leucina-rica en repeticiones 5 (FBXL5), y E3 subunidad ubiquitina ligasa

FCCP: Carbonil cianuro-4- (trifluorometoxi) fenilhidrazona

Fe: Hierro

Fe²⁺/ Fe³⁺: Hierro ferroso/ Hierro férrico

FMN: Flavin-mononucleótido

FPN1: Ferroportina

FT: Ferritina

FTL: Ferritina cadena ligera

FTX: Frataxina

GNDF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

GPI: Glucosil fosfatidilisotol

GTPBP2: Proteína de unión 2 GTP. Gen causante de la enfermedad Jaberí-Elahi

HAND2: Derivados del corazón y la cresta neural expresados 2

HATS: Histonas acetiltransferasas

HDACS: Histonas deacetilasas

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HIF: Factor inducible de hipoxia

HIF2α/EPAS1: Factor inducido por hipoxia 2

HRP: Horseradish peroxidase

HTT: Huntingtina

IC-MS: Espectrofotometría de masas con plasma acoplado inductivamente

IC₅₀: Concentración inhibitoria al 50%

INAD: Distrofia neuroaxonal infantil

iNs: Neuronas inducidas

iPLA2-VIIa: Fosfolipasa A2 calcio independiente

iPSCs: Celulas madre pluripotentes inducidas

IRE: Elementos con respuesta al hierro

IRP1/ IRP2: Proteína reguladora de hierro 1/ Proteína reguladora de hierro 2

ISC: Centro Hierro-Azufre

IST: Indice Saturación transferrina

LCR: Liquido cefalorraquídeo

LDH: Lactato deshidrogenasa

LIP: Labil iron pool, siglas en ingles del Hierro libre

LM: Factor de transcripción LIM

MAP2: Expresión de marcador neuronal asociado a microtubulos

MEF2C: Factor de potenciador de miocitos 2C

MERRF: Síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas

miRNA: MicroRNA

Mit1/2: Mitoferrina 1/ Mitoferrina 2

MitoPeDPP: Peroxidación lipídica mitocondrial

MOI: Multiplicidad de infección

MPAN: Neurodegeneración asociada a proteínas de membrana mitocondrial

MPTP: Nneurotoxina 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina

MRI: Imagen por resonancia magnética

MTDR: MitoTrackerTM Deep Red

MYOD1: Factor de transcripción de Mioblastos 1

MYT1L: Factor de transcripción de mielina 1

NAD: Distrofia neoaxonal atípica

NADH: Dinucleotico nicotinamida adenina reducida

NBIA: Neurodegeneration with brain iron accumulation (siglas en inglés de Neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro)

NCAM: Marcadores neuronales

NEUROD1: Factor de diferenciación neurogénica 1

NFS1: Proteína Cisteína Desulfurasa 1

NG2: Células de glia de expression antigen 2

NT3: Neurotrofina 3

p97: Melanotransferrina

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PANK: Pantotenato quinasa

PANK1: Pantotenato quinasa 1

PANK2: Pantotenato quinasa 2

PANK2: Pantotenato quinasa 2

PANK3: Pantotenato quinasa 3

PANK4: Pantotenato quinasa 4

PARK14: Proteína asociada con inflamación en Parkinson

PARK9: Proteína parkinson 9

PAX: Paired box (6-7)

PBS: Fosfato bufer salino

PFA: Paraformaldehydo

PKAN: Neurodegeneración asociada a Pantotenato quinasa

PLA2G6: Fosfolipasa A2 Grupo 6

PLAN: Neurodegeneración asociada a PLA2G6

PPAC: Fosfopantotenolcisteína descarboxilasa

PPAT: Fosfopantetina adeniltransferasa

PPAT: Fosfopantetina deniltransferasa

PPC: Fosfopantotenolcisteína

PPCS: Fosfopantotenato-cisteína ligasa citosólica

PTB: Proteína de unión al tracto polipirimidina

REST: Factor de transcripción silenciador

RIPA: Bufer de Ensayo de inmunoprecipitación 50 mM Tris-HCl, 150 mM cloruro sodico, 1.0% Triton X- 100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, pH 8.0.

RNAi: Acido ribonucleido interferente

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCP2: Proteína portadora de esteroides

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SEM/EDX: Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive X-ray spectroscopy siglas en inglés de microscopia electronica de barrido

SIH: Salicyladehyde Isonicotinoyl Hydrazone

SLC5A6 (SMVT): Proteina de transporte asociada a la membrana

SMAD: Factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos

SNC: Sistema Nervioso Central

SPG35: Proteina paraplegia espástica 35

SSB: Sudan Black/Negro Sudan

STEAP3: Proteina metaloreductasa endosoma 3

T-TBS: TBS con 0.05% Tween

TBS: Tris-bufer salino

TBX5: T-box 5

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TF: Transferrina

TFRC/TFR1: Receptor de la transferrina1

TFS: Factores de transcripción

TGS: Bufer running (25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)

TUJ1: Marcador neuronal β III-Tubulina

VHL: gen *supresor de tumores* de von Hippel-Lindau

WDR45: WD dominio de repetición 45

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

EL HIERRO COMO ELEMENTO ESENCIAL DE LOS SERES VIVOS

El hierro (Fe) es esencial para casi todos los organismos vivos, ya que participa en una gran variedad de procesos metabólicos críticos que incluyen el transporte de oxígeno, el transporte de electrones, la síntesis de ADN, diversas reacciones enzimáticas y otras funciones celulares (1,2). Las concentraciones celulares de hierro deben controlarse estrictamente debido a la baja solubilidad y a la capacidad de este elemento para formar productos tóxicos que reaccionan con el oxígeno (radicales libres) en la mayoría de los sistemas biológicos (2).

La absorción del hierro es regulada por las células del epitelio intestinal (Figura 11), mientras que el control de las reservas depende de un sistema coordinado en el que intervienen varios compartimentos de distribución y tres proteínas que regulan los mecanismos de transporte (transferrina), reserva (ferritina), y utilización de hierro por parte de las células (receptores de transferrina). El hierro contenido en la carne ingerida es el que se absorbe más fácilmente, ya que atraviesa directamente la mucosa intestinal por difusión simple. El hierro pasa desde las células de la mucosa intestinal a la sangre, y se une a la transferrina. Para que el hierro penetre en el interior del citoplasma celular, la transferrina que lo transporta, debe unirse previamente a su receptor de membrana (receptor de la transferrina; TFR1), presente en casi todas las células del organismo. Las células con mayor número de receptores de transferrina son las que necesitan más aporte de hierro, como los precursores de los eritrocitos (eritroblastos y reticulocitos), o las que intervienen activamente en su mecanismo de reutilización (hepatocitos). Los principales depósitos de hierro del organismo son los macrófagos de la médula ósea, el bazo y el hígado.

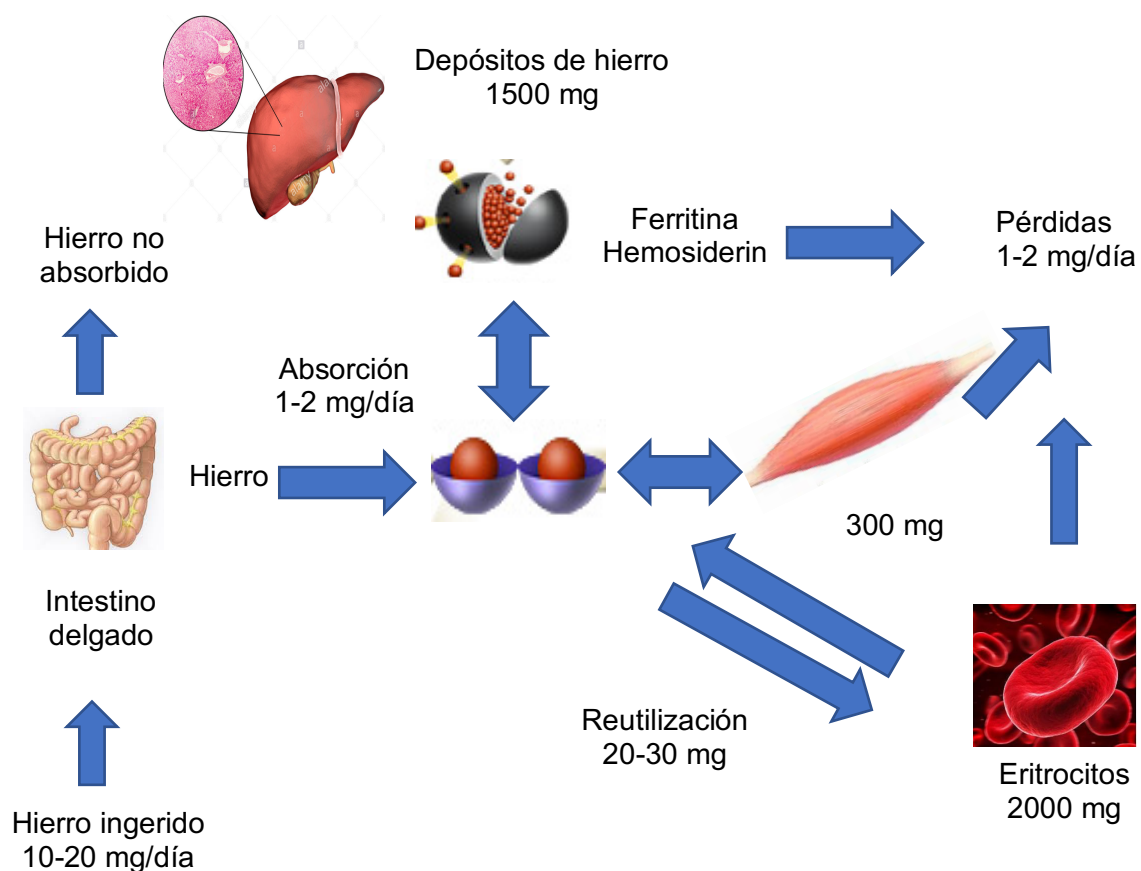


Figura 11. Absorción, transporte, utilización, almacenamiento y reutilización del hierro en humanos. La homeostasis del hierro en mamíferos está regulada principalmente a nivel de absorción intestinal. El hierro una vez que alcanza la circulación unido a la transferrina, es transportado a sitios de uso y almacenamiento. Dado que cada molécula de transferrina puede fijar dos átomos de hierro, en condiciones fisiológicas normales solo se ocupa un 30-40% de la capacidad de unión de la transferrina (índice de saturación de transferrina, IST). Así, la cantidad de hierro unido a la transferrina es alrededor de 3-4 mg, pero se trata del reservorio dinámico más importante del hierro, al ser la transferrina su única proteína transportadora en el plasma. El IST constituye un factor que regula la intensidad de la eritropoyesis, de forma que ésta disminuye drásticamente cuando el IST es inferior al 20%. Por el contrario, cuando el IST es mayor del 90%, el hierro transportado por la transferrina (Tf) se desvía hasta el hígado, pudiendo originar un acúmulo o hemosiderosis hepática.

El hierro unido a la transferrina entra en las células diana (principalmente las células eritroides, pero también células del sistema inmune y hepáticas) a través de un proceso altamente específico de endocitosis mediada por receptor. La transferrina diférica se une al receptor de transferrina 1 (TfR1), localizado en la membrana celular. Cada TfR1 puede unir a dos moléculas

de transferrina, y tiene más afinidad por la Tf-diférrica que por la monoférrica. En el eritroblasto, la síntesis de RTf y la ferritina están reguladas de manera inversa mediante las proteínas reguladoras de hierro 1 y 2 (IRP1, IRP2) que actúan sobre los elementos de respuesta del hierro (IRE) presentes en sus ARNm. Cuando se necesita aumentar la captación de hierro por el eritroblasto, aumenta la producción de RTf y disminuye la de ferritina, y viceversa. Durante la eritropoyesis, la eritropoyetina (EPO) activa la IRP-1, lo que induce una hiperexpresión de RTf por los progenitores eritroides.

A los 120 días de su entrada en circulación, los eritrocitos senescentes son fagocitados por los macrófagos del bazo, hígado o médula ósea, donde la hemooxigenasa cataboliza el grupo hemo y libera Fe^{2+} . Una parte importante de este hierro quedará almacenado en el macrófago en forma de ferritina, sobretodo, y hemosiderina, mientras que la otra atraviesa la membrana del macrófago por medio de la ferroportina-1, se oxida a Fe^{3+} por la ceruloplasmina y se incorpora a la transferrina. Esta vía de reciclaje del hierro es indispensable, ya que los requerimientos diarios de la eritropoyesis son de unos 20-30 mg de hierro, mientras que la absorción intestinal del mismo es, como hemos visto, tan sólo de 1-2 mg/día

IST: Índice de saturación Transferrina; Tf: Transferrina; TfR1: Receptor transferrina 1; IRP1-2: Proteínas reguladoras del hierro, RTf: Receptor transferrina; EPO: Eritropoyetina

El hierro es un elemento esencial, pero también puede ser letal para los seres vivos tanto a concentraciones bajas como altas; debido a su habilidad, en conjunción con el oxígeno, de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar la peroxidación lipídica en las membranas y daño celular. Tanto su déficit como su exceso están asociados a diversas patologías (2).

En soluciones acuosas, este metal puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso) y Fe^{3+} (férrico); esta propiedad hace que sea capaz de participar en un gran número de reacciones, siendo además cofactor de enzimas que participan en el metabolismo del oxígeno (oxidases, peroxidases, catalasas e hidroxilasas), transferencia de electrones (citocromos) y transporte de oxígeno (hemoglobina). En las células el hierro es principalmente usado en la mitocondria, donde participa en la biosíntesis del grupo hemo y los centros Fe/S (ISC) (1-2).

En el sistema nervioso central (SNC), el hierro es necesario para muchas funciones metabólicas críticas. Una función del hierro en el SNC es la biosíntesis de los neurotransmisores dopamina (3) y serotonina (4). El hierro también es importante en la formación de mielina, llevada a cabo por los oligodendrocitos

(5). En los mamíferos, la acumulación de hierro en el cerebro aumenta después del nacimiento, con la captación de hierro en regiones cerebrales que están sometidas a la mielinización (6). En los humanos, hay acumulación de hierro durante la adolescencia en áreas motoras como la corteza motora y la sustancia negra (7, 8). Las reservas de hierro aumentan gradualmente hasta los 40 años y luego permanecen estables (9). Muchos de estos procesos dependientes del hierro dentro del SNC dependen de la edad, como es el caso de la mielinización, o son específicos de la región cerebral, como es el caso de la síntesis de dopamina que se produce en las neuronas de la sustancia negra (10). En el SNC, el hierro también es un componente esencial de las enzimas del metabolismo oxidativo, como las catalizadas por los citocromos y las enzimas de hierro y azufre. Los requerimientos de energía (Adenosín trifosfato; ATP) en el cerebro son altamente necesarios para gradientes iónicos celulares estables, transmisión sináptica y transporte axonal (10). Por lo tanto, la disfunción mitocondrial relacionada con el Fe se ha asociado con la neurogeneración (11). Durante el metabolismo oxidativo del SNC, los ROS normalmente se producen y metabolizan (12), pero un exceso de hierro libre da como resultado un aumento de dichos ROS que pueden ser un mecanismo de muerte celular relacionado con la neurodegeneración (10).

METABOLISMO DEL HIERRO SISTÉMICO

Numerosas proteínas están involucradas en la absorción y distribución de hierro en los mamíferos. El hierro se adquiere de los alimentos en forma de sales de hierro y hemo, y los transportadores de hierro como son el transportador divalente de metal 1 (DMT1; también conocido como SLC11A2) y la ferroportina 1 (FPN1; también conocido como SLC40A1), ayudan al hierro a cruzar la mucosa del duodeno, y entrar en la circulación sistémica (13). La exportación de hierro en la células es mediada por FPN1 que junto con la ferroxidasa hefaestina que está unida a la membrana, oxida el hierro ferroso (Fe^{2+}) a hierro férrico (Fe^{3+}) que es transportado por la sangre unido a la transferrina.

La transferrina generalmente se une dos átomos de Fe^{3+} por molécula para generar holo-transferrina. En el duodeno la hepcidina, una hormona peptídica

secretada por los hepatocitos cargados de hierro, puede unirse a la ferroportina duodenal, inducir su degradación intracelular y, por lo tanto, disminuir la absorción de hierro duodenal (14). Además, la expresión transcripcional de la proteína DMT1 está regulada por el factor inducido por hipoxia 2 α (HIF2 α ; inicialmente llamado EPAS1), que regula de forma coordinada la respuesta transcripcional a la hipoxia y la deficiencia de hierro en la mucosa duodenal (15). La mayoría de las células adquieren el hierro de la holo-transferrina. La holo-transferrina se une a la superficie celular por el receptor de transferrina (TFRC), para posteriormente el complejo sufrir endocitosis. El Fe³⁺ se reduce luego a Fe²⁺ por la metaloreductasa STEAP3 (16) y se transporta a través de la membrana por la proteína DMT1.

En el citosol, el hierro puede transportarse uniéndose a chaperonas que lo unirán a proteínas específicas (17), puede viajar a las mitocondrias e ingresar a la matriz mitocondrial a través de los transportadores mitocondriales de hierro que son la mitoferina 1 o mitoferina 2 (18) o acumularse en el citosol unido a ferritina (como Fe³⁺) o hemosiderina (forma más estable y menos disponible de almacenamiento del hierro). Parte de este hierro será exportado a través de la ferroportina.

Gran parte del hierro que la célula asimila, es acumulado via ferritina, esta proteína puede unirse hasta 4.500 átomos de hierro, acumulándolo en una forma no reactiva, y por lo tanto evita que el hierro libre alcance altas concentraciones en los compartimientos citosólicos y nucleares (19). En la mitocondria existe una ferritina mitocondrial, capaz de almacenar hierro incluso de forma más eficiente que su análoga citosólica. Para el hierro almacenado en la ferritina citosólica, la célula usa un mecanismo basado en la degradación lisosomal y proteosomal (20, 21). (Figura I2)

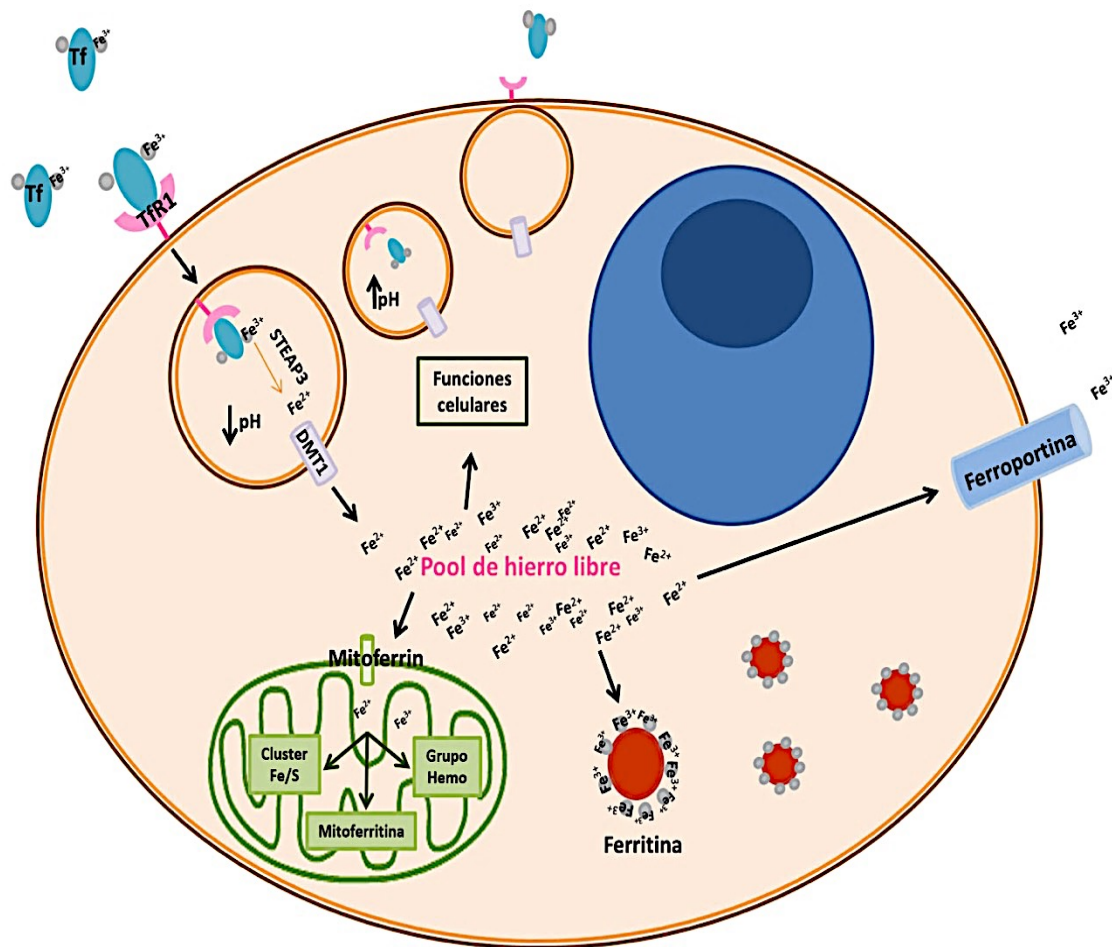


Figura I2: Resumen del metabolismo del hierro y su función celular. La mayor parte del hierro es transportado unido a la transferrina y captado a través de un TfR1 vía endosoma. En el endosoma la feroreductasa STEAP3 reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el cual es transportado al citosol a través de la proteína DMT1. Tras ello el pH del endosoma sube, provocando la separación de la transferrina y su receptor, seguidamente ambos serán reciclados. El hierro citosólico formará parte del "pool" de hierro libre. Parte de este hierro quedará almacenado unido a la ferritina, otra parte participará en diversas funciones celulares. También puede ser trasladado a la mitocondria vía mitoferrin o si se detecta un exceso será secretado a través de la ferroportina. TfR1: Receptor de transferrina 1, DMT1: Transportador Divalente de Metal 1; STEAP3: Feroreductasa. Adaptado (14, 21).

ENTRADA DEL HIERRO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Dentro del SNC, el ciclo del hierro involucra las mismas proteínas y mecanismos que en el metabolismo sistémico, con algunas excepciones.

Las células en el SNC no tienen acceso directo a los nutrientes, incluido el hierro, porque la barrera hematoencefálica (BHE) separa el SNC de la circulación sistémica (22-24). La BHE es una estructura microvascular compleja, formada por células endoteliales, por los pericitos, la lámina basal abluminal, los astrocitos perivasculares y la microglía. La barrera hematoencefálica es una pared semipermeable que se encuentra entre la sangre y el encéfalo. Se compone de las células que forman las paredes de los capilares sanguíneos cerebrales. La BHE permite que las neuronas del sistema nervioso central estén aisladas químicamente del resto del organismo. En gran parte del organismo, las células que forman los capilares sanguíneos no se unen de forma hermética. Estas son las células endoteliales, y poseen hendiduras entre ellas por las que pueden entrar y salir diversas sustancias y se intercambian elementos entre el plasma sanguíneo y el líquido que rodea a las células del organismo (líquido extracelular). En el sistema nervioso central, los capilares no poseen estas hendiduras pero están estrechamente unidas impidiendo que muchas sustancias salgan de la sangre. Hay sustancias concretas que pueden atravesar la BHE. Éstas lo hacen mediante proteínas especiales que las transportan desde a través de las paredes de los capilares. Las células gliales (de sostén), los astrocitos, se agrupan alrededor de los vasos sanguíneos del cerebro y ejerciendo un papel importante en el desarrollo de la barrera hematoencefálica. También contribuyen al transporte de iones desde el cerebro a la sangre. (Figura I3)

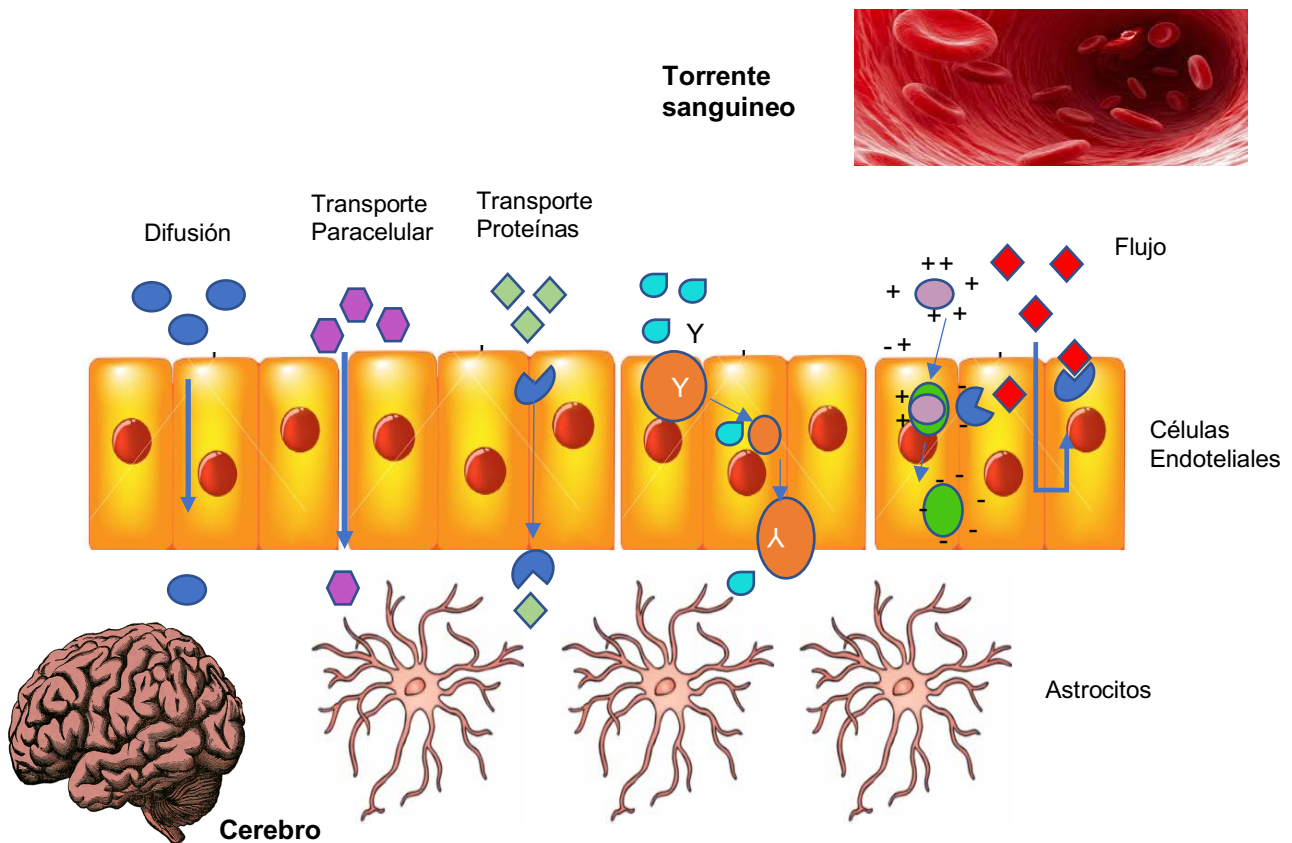


Fig13: Esquema de la barrera hematoencefalica. Difusión de compuestos y moléculas a través de la barrera hematoencefalica desde el torrente sanguíneo hasta el Sistema Nervioso Central.

Los receptores y transportadores permiten la entrada del hierro a través de la membrana luminal de las células endoteliales de la BHE permitiendo la entrada del hierro al SNC. En la membrana luminal, el TFRC media la captación de hierro endotelial (25). La FPN1, que transporta el hierro fuera de la célula, se ha detectado en células endoteliales de la BHE en algunos estudios (26,27), pero no en otros (28), esto puede permitir que el hierro cruce la membrana abluminal para ingresar al líquido intersticial. Las células endoteliales están envueltas por los pies de astrocíticos, que expresan en la membrana la proteína ferroxidasa ceruloplasmina. Esta proteína puede facilitar la actividad de exportación de ferroportina en células adyacentes (29) (figura I4).

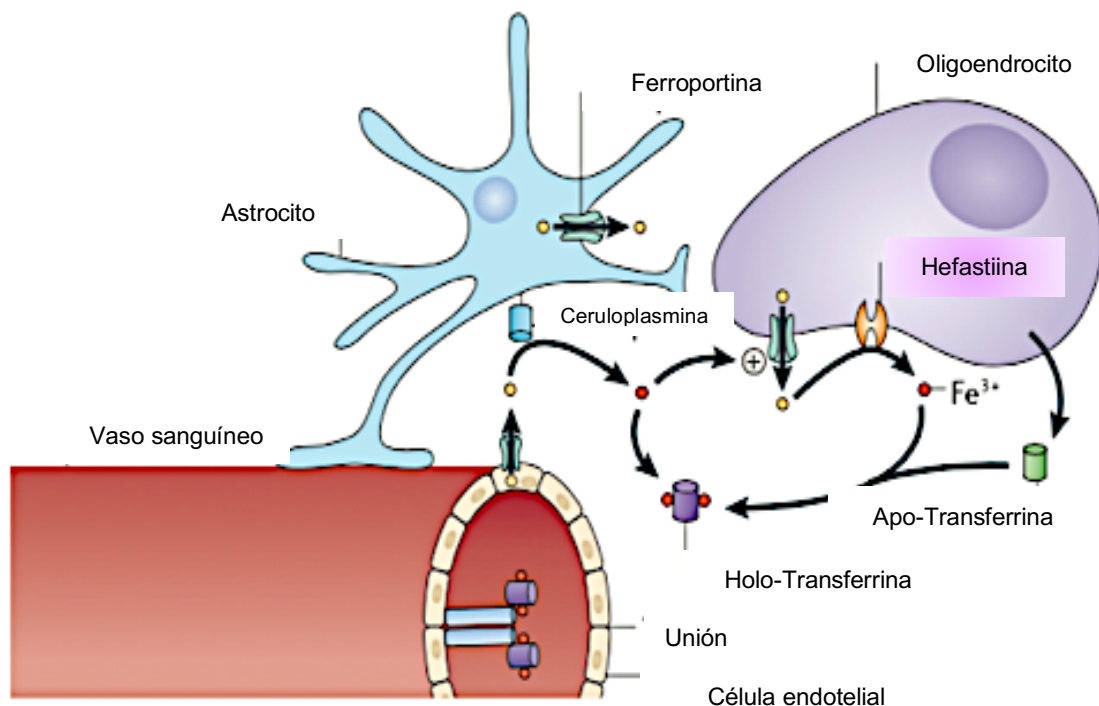


Fig 14: Mecanismo de difusión de hierro a través de la barrera hematoencefálica. La holo-transferrina circula a través de los capilares sanguíneos, y los receptores de transferrina luminal, internalizan el hierro utilizando los mismos mecanismos que para las células no polarizadas. El exportador de hierro ferroportina, puede permitir que el hierro cruce la membrana abluminal de la célula endotelial para ingresar al líquido intersticial. La mayor parte de la transferrina en el líquido intersticial cerebral es sintetizada y secretada por los oligodendrocitos como apo-transferrina. Los astrocitos expresan la ferroxidasa ceruloplasmina, que está unida a la membrana por el glucosil fosfatidilisotol (GPI). La ceruloplasmina y la hefaestina, otra ferroxidasa, se expresan diferencialmente en todo el SNC. Las neuronas y las células de glía adquieren la mayor parte del hierro a través del receptor de transferrina y la holo-transferrina que está presente en el líquido intersticial y el líquido cefalorraquídeo. GPI: glucosil fosfatidilisotol; SNC: Sistema Nervioso Central (Adaptado 31)

Curiosamente, como en las células epiteliales de la mucosa duodenal, el factor inducido por hipoxia HIF2 α se expresa altamente en las células endoteliales del cerebro (30). Las proteínas HIF son sensibles al oxígeno y al hierro debido a su degradación a través de la vía del supresor tumoral VHL (31). La presencia de HIF2 α en la vasculatura cerebral, aumenta la posibilidad de que el flujo sanguíneo esté regulado tanto por las condiciones de hipoxia como por la deficiencia de hierro (32). En el SNC, la transferrina se sintetiza y secreta principalmente por oligodendrocitos y células del plexo coroideo (33). Es

probable que el hierro ingrese al SNC no solo a través de las células endoteliales de la BHE (28, 34) sino también a través de las células epiteliales del plexo coroideo, utilizando muchos de los mismos transportadores que se han identificado en el duodeno (34). A diferencia de los capilares de la BHE, los capilares del plexo coroideo están fenestrados y la holo-transferrina puede atravesar fácilmente las células endoteliales para llegar a la membrana basolateral del epitelio coroideo polarizado, donde las uniones estrechas entre las células hacen necesario que el hierro atraviese la célula epitelial. Al ingresar el líquido intersticial o el líquido cefalorraquídeo (LCR) en los ventrículos, el hierro se une a la transferrina sintetizada en el SNC y se difunde a través del LCR como holo-transferrina (23), entrando hierro a las células dentro del SNC expresando TFRC. Finalmente, la apo-transferrina (transferrina libre de hierro) y la holo-transferrina, regresan a la circulación sistémica atravesando las vellosidades aracnoideas (23,28).

METABOLISMO DEL HIERRO EN EL CEREBRO

En la mayoría de las células de nuestro organismo, incluso las del cerebro, se encuentran proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, como son TFRC y DMT1 para la absorción de hierro, la ferritina, para la captación de hierro, las proteínas mitoferrina 1 y / o mitoferrina 2 para suministra hierro a las mitocondrias, el exportador de hierro citosólico FPN1 y la proteínas reguladoras de hierro 1 y 2 (IRP1; IRP2) para regular la homeostasis intracelular de hierro (35). Sin embargo, la cantidad de cada proteína expresada varía mucho según el tipo de célula.

Se han descrito diferentes tipos de tinciones específicas para la detección del hierro en células cerebrales; los oligodendrocitos se tiñen fuertemente para la detección de la transferrina, mientras que las células de microglia se tiñen más fuertemente para la ferritina, y las neuronas se tiñen muy fuertemente para TFRC. Las tinciones para cada una de estas proteínas se utilizaron inicialmente como marcadores para distinguir diferentes tipos celulares (36). La incapacidad para identificar TFRC en oligodendrocitos maduros ha llevado a la afirmación de que los oligodendrocitos adquieren hierro de la ferritina (37), aunque los

oligodendrocitos inmaduros expresan TFRC (37). La mayoría de las células cerebrales captan el hierro vía TFRC y endosomal DMT1, lo acumulan unido a ferritina y lo exportan a través de ferroportina. Las proteínas ferroxidasas de hierro como son la ceruloplasmina y la hefaestina, son casi un 50% idénticas, se expresan ampliamente en todo el SNC y su función es facilitar la actividad de exportación de la ferroportina (38). La hefaestina codifica una secuencia de un péptido transmembrana que se une al componente de la membrana plasmática de las células. La ceruloplasmina soluble es detectable en el LCR a una concentración baja (1,5 μg por ml), que es aproximadamente 100 veces menor que la concentración de ceruloplasmina en suero (39). En el SNC, la mayoría de la ceruloplasmina es sintetizada por los astrocitos y su función es la de mantener y proteger a las neuronas. La ceruloplasmina presenta una forma fija ligada a glucosilfosfatidilisotol (GPI), que es esencial para el procesamiento del hierro (40). La ceruloplasmina soluble en el LCR puede liberarse principalmente mediante la escisión del enlace GPI en los astrocitos.

Dado que la homeostasis celular del hierro es vital para la integridad de la célula, su metabolismo es un proceso altamente controlado. Principalmente está regulado post-transcripcionalmente por las IRPs (35,41-43). Las proteínas reguladoras IRPs que se unen a los elementos responsables de hierro (IREs) localizados en el ARNm, codificando proteínas encargadas de la asimilación, almacenaje, utilización y salida de este metal. Cuando existe una deficiencia de hierro, las IRPs están libres y se unen a los sitios IRE, formando lazos en el ARNm; cuando estas estructuras se forman en la región 3' UTR se potencia la traducción del ARNm. Contrariamente, cuando los lazos se forman en la región 5' UTR se reprime la traducción, esta regulación pretende aumentar la toma de hierro y reducir su almacenaje para aumentar su biodisponibilidad. Cuando existe un exceso de hierro, el centro hierro-azufre se une a la proteína IRP1, convirtiéndola en una aconitasa citosólica incapaz de unirse a las zonas IRE; por otra parte se activa la degradación de IRP2 a través del complejo ligasa FBXL5 E3 vía proteosoma, proporcionando el efecto contrario de lo explicado anteriormente (Fig I5) (44).

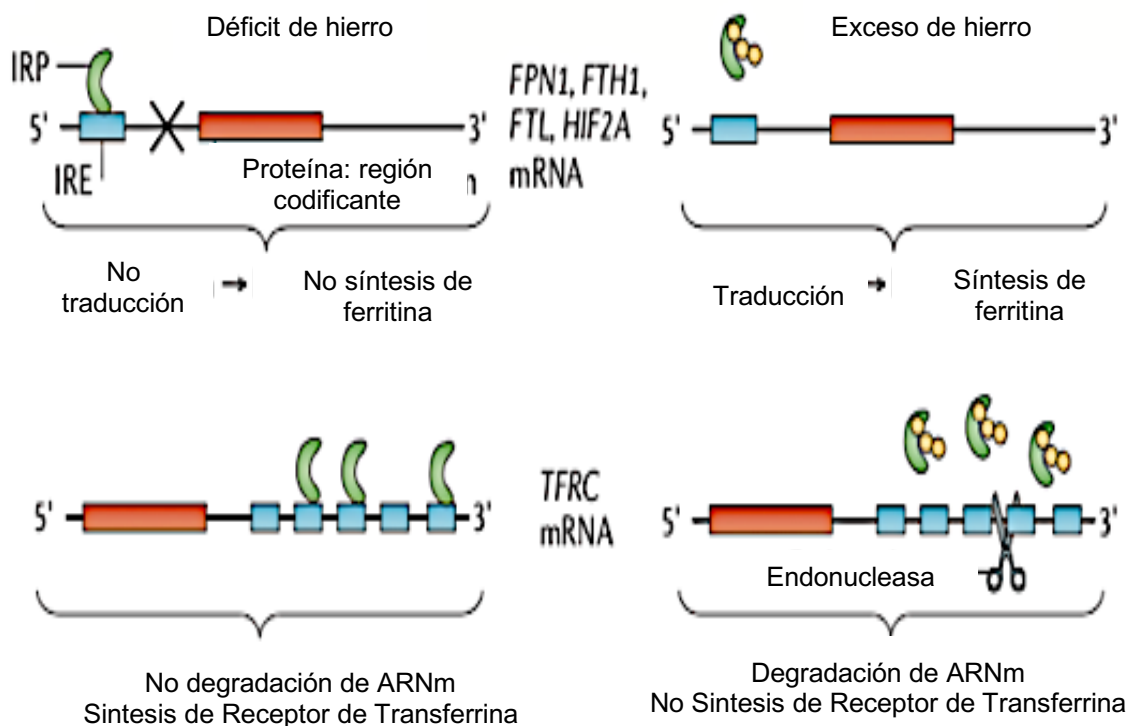


Fig I5. Metabolismo del hierro, exceso y déficit de hierro. Las proteínas reguladoras de hierro 1 (IRP1) y el IRP2 afectan a la regulación postranscripcional del metabolismo celular del hierro al detectar los niveles de hierro en el citosol y luego unirse a los elementos sensibles al hierro (IRE) cuando los niveles de hierro son bajos. Si los niveles de hierro son bajos, las IRPs están libres y se unen a los sitios IRE, y forman lazos en el ARNm; cuando estas estructuras se forman en la región 3' UTR se potencia la traducción del ARNm, si se forman en la región 5' UTR se reprime la traducción, y aumentando los niveles de hierro. Cuando los niveles de hierro son altos, los centros hierro-azufre se unen a IRP1 que no se puede unir a IRE, dándose la traducción para la producción de ferritina. Se produce la activación de una endonucleasa, provocando la degradación de IRP2, potenciando la degradación del ARNm y bajando los niveles de hierro disponibles. IRP 1-2: Proteínas reguladoras del hierro; TfR1: Receptor de transferrina 1, DMT1: Transportador Divalente de Metal 1; IRE: Elementos respondedores al hierro. (Adaptado 31).

Por lo tanto, parece probable que cada tipo de célula del SNC, regule su propia homeostasis de hierro, distribuyendo y almacenando el hierro de acuerdo con las necesidades y funciones particulares de cada tipo de celular (34). Sin embargo, existe cierta especialización del metabolismo del hierro en el cerebro: los astrocitos sintetizan la ceruloplasmina ligada a GPI, y los oligodendrocitos sintetizan principalmente hefaestina (45). Además, la transferrina se sintetiza y

secreta en el líquido intersticial del SNC principalmente por oligodendrocitos. La transferrina secretada, se une el hierro que se ha importado al SNC y la holotransferrina redistribuye el hierro a las células del líquido cefalorraquídeo y al líquido intersticial. Este proceso se ve facilitado por la difusión y el flujo masivo del líquido cefalorraquídeo a través de los ventrículos y hacia los espacios intersticiales para regresar a través del sistema venoso a la circulación sistémica.

ACUMULACIÓN DE HIERRO EN EL CEREBRO

La acumulación de hierro ocurre en el cerebro de animales que envejecen, incluidos los humanos. Esta acumulación tiene lugar en áreas asociadas principalmente con la actividad motora, incluido el globo pálido, el núcleo rojo, el núcleo dentado y la sustancia negra (46-49), pero los factores que favorecen la acumulación en ciertas zonas de hierro siguen siendo desconocidos. Estas regiones del cerebro están enriquecidas con hierro en forma de ferritina, que tiende a acumularse en los seres humanos en la tercera década de la vida según los ensayos de histopatología e inmunohistoquímica (50, 51). Los niveles de hierro en el globo pálido son tan altos como los niveles en el hígado humano, que es un depósito conocido de hierro (52). No se sabe por qué se almacena tanto hierro en el globo pálido y otros ganglios basales, pero es posible que algunas neuronas especializadas en el globo pálido y los ganglios basales, estén programadas para transcribir grandes cantidades de ferritina y, por lo tanto, crear una ferritina como depósito de hierro en el SNC, análogo al depósito de hierro del hígado creado por los hepatocitos que sirve para su liberación a la circulación sistémica. Quizás los diferentes tipos celulares desconocidos hasta ahora, como los descubiertos recientemente en el globo pálido (53), están programados para almacenar hierro y crear un depósito de hierro en el SNC. La acumulación de hierro asociada con el envejecimiento generalmente no está asociada con la patología (la mayoría de los individuos que envejecen no desarrollan enfermedad neurodegenerativa). Esto sugiere que el hierro observado está contenido en células sanas, ricas en ferritina, que pueden incluir tipos de neuronas y / o oligodendrocitos, astroglia y microglia.

La composición de las células y el contenido de hierro de una región del cerebro pueden cambiar cuando un área rica en hierro comienza a degenerarse. Cuando una célula muere, las células de la microglia y/o los macrófagos invaden desde la circulación periférica y eliminan los restos liberados por las células degeneradas (54). Cuando muchas células mueren en un área cerebral rica en hierro, estas células, se vuelven ricas en este elemento al fagocitar los restos celulares ricos en hierro. Además, las células de la microglia expresan altas cantidades de ferritina tras su activación funcional (55). Algunas enfermedades, incluida la enfermedad de Parkinson, parecen afectar específicamente a áreas ricas en hierro como la sustancia negra (56,57). Esto hace difícil determinar si la acumulación de hierro observada a menudo en la enfermedad de Parkinson es una causa o una consecuencia de la degeneración de las neuronas de la sustancia negra. (58) De manera similar, en la enfermedad de Huntington, la ferritina microglial y la acumulación de hierro ocurren en edades tempranas, lo que plantea la cuestión de si estos cambios son el resultado que causan pérdida neuronal (59). La sobrecarga de hierro que se produce en la enfermedad de Alzheimer es un tema de debate, ya que no se detecta en muchos estudios (60) pero la acumulación de hierro como causa de la enfermedad ha sido propuesta por muchos investigadores (61,62) y los hallazgos de la resonancia magnética así lo sugieren (63).

ENFERMEDADES QUE PRESENTAN ACUMULACIÓN CEREBRAL DE HIERRO

El aumento del contenido total de hierro en el cerebro es una característica de algunos trastornos neurodegenerativos y se cree que está involucrado en la fisiopatología de muchas de estas enfermedades (3). En varias enfermedades neurodegenerativas se ha localizado una mayor concentración de hierro parenquimatoso cerebral en regiones cerebrales específicas o sistemas neuronales (3, 64, 65). En ciertos trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, la ataxia de Friedreich, la neuroferrinopatía, la aceruloplasminemia hereditaria se encuentra presente la acumulación de hierro en los ganglios basales (1, 64, 65, 66). No se conoce exactamente cómo está involucrado el aumento del hierro en determinadas zonas del cerebro con el daño neuronal, pero el mecanismo potencial más frecuentemente citado es la capacidad del hierro para promover el daño oxidativo (3, 64, 67). Se ha propuesto que algunas regiones del cerebro o grupos neuronales específicos, es decir, las neuronas dopaminérgicas, son más propensas a la producción de ROS mediada por el hierro a través de la reacción de Fenton (68). Por otra parte, la presencia de altos niveles de hierro en los cuerpos de Lewy y placas seniles en la enfermedad de Parkinson (69) sugiere una posible relación. El hierro y el estrés oxidativo pueden provocar daños y agregación de proteínas. De hecho, se ha demostrado que el hierro *in vitro* promueve la agregación de la sinucleína, proteína nuclear y sináptica, que es el principal componente de los cuerpos de Lewy (70). Los ROS se producen durante el metabolismo cerebral (12, 68) y se han visto niveles plasmáticos significativamente más altos de radicales hidroxilo en la enfermedad de Parkinson (71), junto con el aumento de los productos de peroxidación lipídica en el LCR y el cerebro (72, 73), lo que sugiere un papel en la neurodegeneración.

Desde hace décadas tanto el exceso como la deficiencia de hierro se ha visto asociada a múltiples patologías relacionadas con la edad y la capacidad cognitiva. La ferroptosis es la muerte celular dependiente de hierro, provocada por la peroxidación de los fosfolípidos de membrana. Este proceso comienza en las membranas del retículo endoplasmático asociadas a las membranas

mitocondriales, y está relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Todos estos datos hacen ver lo importante que es la homeostasis celular del hierro y los problemas que acarrearían las alteraciones en su metabolismo.

Enfermedad de Alzheimer

La acumulación excesiva de hierro y el daño oxidativo se han asociado con la enfermedad de Alzheimer y pueden contribuir a la patogénesis o progresión de la enfermedad (10). En esta enfermedad, el hierro está asociado a las placas seniles (75) a la deposición de fragmentos del péptido β -amiloide y el procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (7, 76-78). El análisis post-mortem de cerebros con enfermedad de Alzheimer, indica la acumulación de hierro dentro de regiones cerebrales específicas de vulnerabilidad selectiva a la neurodegeneración, como son el hipocampo y la corteza cerebral (79,80). Se ha sugerido que la acumulación de hierro en la enfermedad de Alzheimer es una fuente importante de ROS generados por reacciones redox que contribuyen al daño oxidativo en esta enfermedad (81).

Los ovillos neurofibrilares y las placas seniles contienen metales activos redox como el hierro. Estos son sitios importantes para la actividad catalítica (82). La inmunorreactividad de la proteína Hemo Oxigenasa (HO) aumenta enormemente en neuronas y astrocitos del hipocampo y la corteza en sujetos con Alzheimer (83). Otras proteínas de unión al hierro se han asociado con la neurodegeneración de Alzheimer, incluida la transferrina, la ferritina y el IRP2.

El tejido cerebral de sujetos con Alzheimer, ha mostrado transferrina localizada en células gliales y melanotransferrina en células de glía asociadas con placas seniles (84). Las células de microglía que contienen ferritina, núcleos de ferritina y hierro oxidado en pequeñas cantidades, se han observado en placas seniles de cerebros con Alzheimer (76, 85, 86), lo que sugiere un posible papel de la ferritina en la alteración de la homeostasis del hierro cerebral. Claramente, IRP2 también tiene un papel importante en la neurodegeneración, evidenciada por la colocalización de IRP2 en neuritas seniles (87), por la sobrecarga de hierro del SNC y la degeneración de neuronas en ratones con delección del gen IRP2 (88).

El aumento de la expresión de melanotransferrina (p97) se ha evaluado como un marcador bioquímico para la enfermedad de Alzheimer (89).

Numerosos grupos han informado que p97 no está elevado en otras enfermedades neurodegenerativas y puede estar relacionado con la sobreexpresión de células de glia en la placa senil (90, 91).

Enfermedad de Parkinson

Se ha demostrado alteración de la homeostasis del hierro y ganglios basales en la enfermedad de Parkinson (92). El origen del aumento del contenido de hierro en la enfermedad de Parkinson es actualmente desconocido. Específicamente en la enfermedad de Parkinson, hay un aumento de la carga de hierro de ferritina intracelular (68) y los depósitos de hierro se encuentran dentro de las neuronas degeneradas, de la sustancia negra, que sufren apoptosis en los cuerpos de Lewy (12, 93). Debido a que el hierro está atrapado en los cuerpos de Lewy de la sustancia negra (69), se sospecha un aumento del transporte de hierro hacia dicha región de las reservas de ferritina o neuromelanina (68). Es de destacar que el hierro asociado con la neuromelanina se acumula significativamente dentro de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson (94) y se ha sugerido que este mecanismo puede desempeñar un papel en la neurodegeneración selectiva observada en dicha enfermedad (12,95). La inmunorreactividad de la proteína hemo oxigenasa aumenta considerablemente en los cuerpos de Lewy que se encuentran en la sustancia negra de los cerebros afectados por la enfermedad de Parkinson (83).

La toxina 1- metil-4 fenil, 6 tetrahidropiridina (MPTP), es una toxina neuronal específica en la sustancia negra que causa parkinsonismo, induce selectivamente la expresión de la hemo oxigenasa (HO) en los astrocitos estriatales (96), lo que sugiere un posible papel de HO en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. La lactoferrina es estructuralmente similar a la transferrina y se une al hierro de forma reversible, pero la función exacta de la lactoferrina y su receptor en el SNC sigue siendo desconocida. Se ha encontrado que la expresión de receptores de lactoferrina en neuronas aumenta en regiones de degeneración neuronal en el mesencéfalo del tejido cerebral *postmortem* en

Parkinson y sugiere un posible vínculo a la sobrecarga de hierro en las regiones cerebrales afectadas (97). Experimentos con ratones han demostrado que una interrupción dirigida en el gen IRP2 muestran una regulación errónea del metabolismo del hierro en el cerebro y un trastorno neurodegenerativo con sobrecarga cerebral de hierro significativa (88). En cerebros con lesiones que sufren Alzheimer, se puede ver que la proteína IRP2 presenta colocalización con hierro redox-activo, en cambio no se aprecia dicho proceso en pacientes con enfermedad de Parkinson (87,98). Gracias a los avances en investigación sobre este tipo de patologías cada vez se tiene más conocimiento sobre dichas enfermedades ayudando a ser abordadas por los especialistas.

Ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich es un trastorno neurodegenerativo, que se ha asociado con una expansión de tripletes repetidos en el gen de la frataxina (FTX) (99) que conduce a una reducción de la transcripción y traducción del ARNm de la FTX (100). Los pacientes con ataxia de Friedreich muestran sobrecarga de hierro mitocondrial (101) y deficiencia de las enzimas que contienen centros hierro-azufre en el SNC (102). En la ataxia de Friedreich, se ha sugerido que la disminución de los niveles de frataxina y el aumento de hierro dentro de las mitocondrias conducen a estrés y daño oxidativo en las neuronas espinales sensoriales (100, 64).

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por un deterioro motor, cognitivo y psiquiátrico progresivo. La enfermedad de Huntington es causada por repeticiones de trinucleótidos CAG dentro del exón 1 de HTT, el gen que codifica la huntingtina. Las personas con enfermedad de Huntington tienen entre 36 y 121 repeticiones de trinucleótidos CAG, en comparación con entre 6 y 34 en el gen no mutado (103). La expansión dominante de poliglutamina dentro del extremo N de la proteína huntingtina, provoca la pérdida neuronal, principalmente en el cuerpo estriado y corteza cerebral. En las células madre embrionarias, la huntingtina está regulada por el hierro y también está involucrada en la regulación de la homeostasis del hierro

(104). Las imágenes por resonancia magnética, identificaron alteraciones en el metabolismo cerebral del hierro con una mayor acumulación de hierro en pacientes con enfermedad de Huntington (105) y en particular en los ganglios basales (núcleo caudado, putamen y globo pálido) (106, 107).

NACH

Las NACH son un grupo de trastornos neurodegenerativos raros caracterizados por la disfunción extrapiramidal progresiva (disonía, rigidez y coreoatetosis), discapacidad mental, acumulación de hierro en el cerebro y la presencia de esferoides axonales en el sistema nervioso central que corresponden a las neuronas degeneradas (108, 109). El hierro se acumula en los ganglios basales y puede ser acompañado por cuerpos de Lewy. También se extiende a otras áreas del cerebro como son el cerebelo o sustancia negra. Se han observado inflamaciones axonales e hiperfosforilación de la proteína Tau en función del subtipo de NACH.

Herencia y genes causantes de la enfermedad

Asociadas a la NACH se han detectado mutaciones en 15 genes incluyendo los genes de la Ceruloplasmina (CP) y de la cadena ligera de la ferritina (FtL), ambos directamente involucrados en la homeostasis del hierro. También encontramos los genes de la pantotenato quinasa 2 (PANK2), la fosfolipasa A2 Grupo VI (PLA2G6), la ácido graso hidroxilasa 2 (FA2H), la coenzima A sintetasa (COASY), C19orf12, WDR45, SCP2, GTPBP2, ATP13A2, DCAF17 (C2orf37), CRAT, REPS1, AP4M1 (110, 280). Estos genes están involucrados en vías celulares aparentemente no relacionadas, tales como el metabolismo lipídico, la síntesis de Coenzima A y la autofagia (111, 280). Con una frecuencia estimada en la población general entre una y tres personas por millón de individuos, las NACH se caracterizan por tener un inicio que varía desde la infancia a la edad adulta con una progresión rápida o lenta con largos períodos de estabilidad.

La forma más común de NACH está asociada con un defecto en el gen de la enzima PANK2 que es esencial para la síntesis de coenzima A (CoA); esta forma representa aproximadamente el 50% de los casos y es la más estudiada (112). En las NACH a nivel celular, los hallazgos histopatológicos en el tejido cerebral, presentan degeneración en las neuronas y los astrocitos. En el sistema nervioso central, el hierro citoplasmático se almacena en la ferritina o se transfiere a orgánulos ricos en hierro, como son las mitocondrias. El estado redox celular

está controlado a través de vías, como son, DMT1, ferritina y ceruloplasmina. La acumulación de hierro suele ir acompañada de un metabolismo lipídico anormal y producción de ROS.

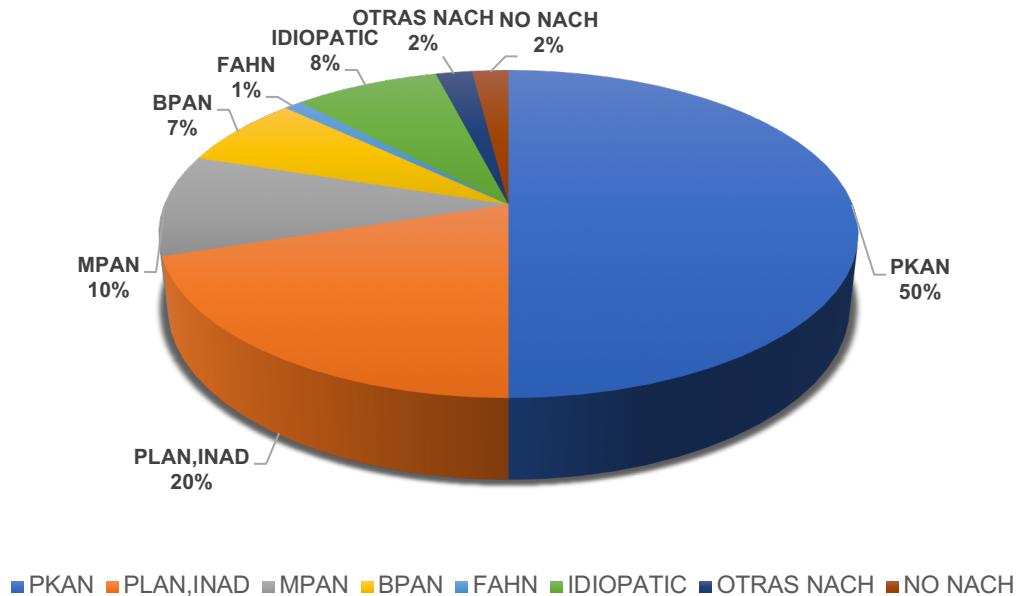


Fig16: Distribución prevalencia de NACH. Dentro de las NACH el subtipo más prevalente es la PKAN con un 50% de los casos diagnosticados, seguida de PLAN con un 20%, MPAN un 10%, y BPAN un 7%. El porcentaje restante se reparte en el resto de subtipos NACH y otras entidades clínicas con un cuadro clínico similar pero sin diagnóstico molecular.

Las NACH son enfermedades de origen genético que, aunque existen casos esporádicos, siguen un patrón de herencia mendeliana, en su mayoría con transmisión autosómica recesiva. Dentro de las NACH también podemos encontrar casos como son la neuroferritinopatía, que se transmite de forma autosómica dominante y BPAN (Neurodegeneración asociada a la proteína beta-hélices), causada por mutaciones en el gen *WDR45* que se hereda de manera dominante ligada al cromosoma X y se sospecha que provoca letalidad masculina (113). Por otro lado, en el 15% de los casos afectados por NACH, la enfermedad se asocia a consanguineidad (114-115) (Tabla I1).

Tabla I1: Tipos de neurodegeneraciones con el tipo de herencia mendeliana, gen mutado y localización cromosómica que presenta cada una de ellas.

ENFERMEDAD	HERENCIA	Gen mutado/ % NBIA asociado	Localización	Síntomas
Neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa (PKAN)	Autosómica Recesiva	<i>PANK2</i> 35-50 %	Mitocondria (espacio intermembrana)	Distonía, plasticidad, deterioro cognitivo, retinopatía pigmentaria
Neurodegeneración asociada a PLA2G6 (PLAN)	Autosómica Recesiva	<i>PLA2G6</i> 20 %	Mitocondria, Reticulo endoplasmático y Citosol	Distrofia infantil neuroaxonal, retraso mental y motor progresivo, ataxia cerebelar, signos piramidales
Neurodegeneración asociada a proteínas de membrana mitocondrial (MPAN)	Autosómica Recesiva	<i>C19orf12</i> 6-10 %	Mitocondria y Reticulo endoplasmático	Hierro en el ganglio basal, hígado, páncreas y miocardio, deterioro cognitivo, diabetes mellitus, degeneración de retina, distonía facial y del cuello, corea, disartria, ataxia
Neurodegeneración asociada a la proteína beta-hélices (BPAN)	Dominante ligado al cromosoma X	<i>WDR45</i> 1-2 %	Retículo endoplasmático	Signos extrapiramidales, distonía, distonía orofacial, deterioro cognitivo

ENFERMEDAD	HERENCIA	Gen mutado/ % NBIA asociado	Localización	Síntomas
Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora	Autosómica recesiva	SCP2 <1 %	Peroxisomas	Distonía y tortícolis espasmódica, ataxia espinocerebelosa, alteración de la marcha y del equilibrio
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	CRAT <1 %	Mitocondria	Degeneración espinocerebelosa lentamente progresiva. Atrofia cerebelosa y leucodistrofia
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	AP4M1 <1 %	Endosoma	Retraso en el desarrollo de inicio temprano y deterioro de la función motora, discapacidad intelectual
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	REPS1 <1 %	Citoplasma y Endosoma	Hipotonía del tronco encefálico, ataxia cerebelosa progresiva, síndrome piramidal
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	GTPBP2 <1 %	Citoplasma	Atrofia cerebelosa, retraso mental, ataxia y distonía

ENFERMEDAD	HERENCIA	Gen mutado/ % NBIA asociado	Localización	Síntomas
Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora	Autosómica recesiva	SCP2 <1 %	Peroxisomas	Distonía y torticolis espasmódica, ataxia espinocerebelosa, alteración de la marcha y del equilibrio
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	CRAT <1 %	Mitocondria	Degeneración espinocerebelosa lentamente progresiva. Atrofia cerebelosa y leucodistrofia
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	AP4M1 <1 %	Endosoma	Retraso en el desarrollo de inicio temprano y deterioro de la función motora, discapacidad intelectual
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	REPS1 <1 %	Citoplasma y Endosoma	Hipotonía del tronco encefálico, ataxia cerebelosa progresiva, síndrome piramidal
Sin nombre definido	Autosómica recesiva	GTPBP2 <1 %	Citoplasma	Atrofia cerebelosa, retraso mental, ataxia y distonía

La presencia de diferentes hallazgos clínicos y las pruebas de genética molecular hacen posible el diagnóstico del tipo específico de NACH (116,117). Gracias a los avances en los últimos años se ha podido comprobar que las mitocondrias juegan un papel muy importante, ayudando a los investigadores a ser más conocedores del tema, así como su diagnóstico y posible tratamiento (116) (Figura I7, Tabla I2).

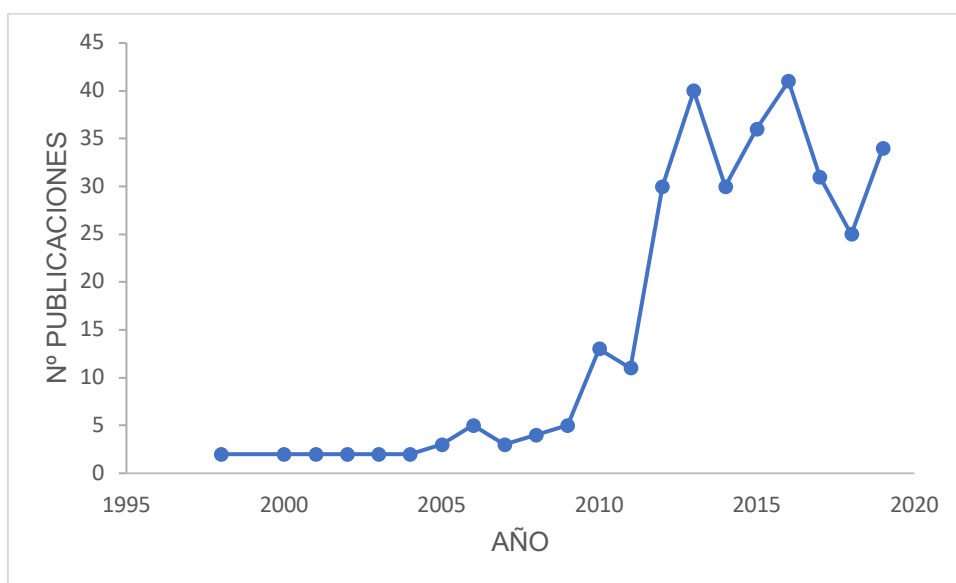


Fig I7: Cronología esquemática que ilustra el número de publicaciones relacionadas con la desregulación de las mitocondrias en las NACH. Se puede apreciar que en los últimos años se ha producido un gran incremento de publicaciones sobre NACH siendo en el año 2019 un total de 34 publicaciones, aumentando su conocimiento sobre este tipo de patologías facilitando su diagnóstico.

Tabla I2: Esquema de los diferentes subtipos ENACH que presentan disfunción mitocondrial. En la siguiente tabla se muestra la función proteica de cada una de las diferentes patologías relacionadas con disfunción mitocondrial así como su localización celular y zona afectada en los pacientes.

SUBTIPO ENACH	GEN	Función de la proteína	Localización celular	Zona afectada
Neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa 2 (PKAN)	Pantotenato quinasa 2 (PANK2)	Enzima esencial para la regulación de la biosíntesis del coenzima A	Mitocondria (espacio intermembrana)	Globo palido
Neurodegeneración asociada a la proteína CoPAN	CoA Sintetasa (COASY)	Enzima que interfiere en la biosíntesis del CoA	Mitocondria (matriz mitocondrial) y citosol	Globo palido y sustancia negra
Neurodegeneración asociada a la fosfolipasa 2	Fosfolipasa A2 Grupo VI (PLA2G6)	Interfiere en la biosíntesis de los ácidos grasos y fosfolípidos	Mitocondria y Citosol	Globo palidos y sustancia negra
Neurodegeneración asociada a la proteína de membrana mitocondrial (MPAN)	C19orf12	Desconocida	Mitocondria	Globo palido y sustancia negra

TIPOS DE ENACH

Neurodegeneración asociada a PLA2G6 (PLAN), NACH tipo 2.

El subtipo PLAN se produce por mutaciones en el gen PLA2G6. La proteína PLA2G6 se expresa tanto en el retículo endoplasmático, citosol como en las mitocondrias, desempeñando un papel muy importante en el metabolismo de los lípidos y remodelación de las membranas. El mal funcionamiento de esta proteína puede producir daño en las membranas neuronales y pueden culminar con deterioro neurológico progresivo (120,280).

Se observan tres fenotipos clínicos:

- La Distrofia neuroaxonal infantil (INAD). Las manifestaciones suelen comenzar entre los seis meses y los tres años con regresión del desarrollo, hipotonía inicial, retraso psicomotor progresivo y tetraparesia espástica progresiva.

- La Distrofia neoaxial (NAD) atípica. Menos común que INAD; las manifestaciones comienzan más tarde en la infancia con una progresión más lenta; la distonía y la tetraparesia espástica son frecuentes. Los pacientes a menudo presentan retraso en el habla y disminuyen las interacciones sociales.

- La Distonía-parkinsonismo relacionado con PLA2G6. El inicio de la distonía-parkinsonismo subagudo ocurre a finales de la adolescencia / principios de la edad adulta. Los síntomas incluyen anomalías en el movimiento de los ojos, signos del tracto piramidal y marcado deterioro cognitivo (115).

Aceruloplasminemia

La aceruloplasminemia está causada por la ausencia completa de actividad de la ferroxidasa, ocasionada por una mutación homocigota en el gen de la ceruloplasmina (3q23-q24), y con transmisión autosómica recesiva.

Las mutaciones pueden tener varias consecuencias para la función proteica. La proteína mutante es retenida en el retículo endoplasmático, donde le induce una respuesta al estrés. La proteína mutante no puede unirse al cobre para formar la holoproteína estable y funcional produciéndose una forma de ceruloplasmina inestable que se transloca a la membrana plasmática, pero no puede estabilizar la ferroportina. Independientemente del mecanismo, en todos los casos la ferroportina permanece internalizada y, por lo tanto, evita la exportación de hierro, lo que resulta en la acumulación intracelular de mismo. Los niveles elevados de hierro pueden desencadenar la producción de ROS, lo que puede conducir al daño oxidativo de los componentes de las células (113).

La alteración en esta proteína provoca una acumulación excesiva de hierro en cerebro, hígado y páncreas. Los cambios neurológicos incluyen distonía facial y del cuello, disartria, temblores, corea, ataxia y blefaroespasma (115). Se han probado algunas terapias que aparentemente arrojan resultados positivos, como el tratamiento con quelantes de hierro como deferiprona o deferoxamina, o fármacos antioxidativos, aunque aún es necesario realizar más estudios al respecto (115).

Neuroferritinopatía

La neuroferritinopatía se asocia con mutaciones en el gen de la cadena ligera de la ferritina, una de las subunidades de la proteína de almacenamiento de hierro. En los pacientes afectados por este tipo de patología, los cuerpos de inclusión de ferritina en el núcleo y el citoplasma, evitan la unión del hierro a la ferritina y conducen a niveles elevados de hierro intracelular. Este exceso de hierro puede inducir estrés oxidativo al aumentar los niveles de ROS, lo que resulta en daño celular. Además, la célula parece compensar los altos niveles de hierro mediante la disminución de la expresión de TFRC.

La neuroferritinopatía progresa desde la participación de extremidades a un trastorno del movimiento más generalizado; la mayoría de los individuos afectados desarrollan una distonía orofacial específica de acción específica relacionada con el habla (115). El inicio de la enfermedad se produce alrededor de los 40 años. No existen tratamientos efectivos.

Neurodegeneración asociada a FA2H (FA2HN/SPG35)

Es una enfermedad autosómica recesiva provocada por mutaciones en el gen de la hidroxilasa de ácidos grasos (*fatty acid hydroxylase*, *FA2H*), que participa en el metabolismo de las vainas de mielina al producir ácidos grasos libres 2-hidroxi necesarios para la biosíntesis de ceramida, galactosilceramida y sulfátido, los constituyentes de mielina SNC normal.

Mutaciones en el gen FA2H produce niveles reducidos de la proteína, lo que lleva a un descenso de esfingolípidos 2-hidroxilados y una posterior degeneración de las vainas de mielina (113). FAHN generalmente comienza en la infancia y es lentamente progresiva con distonía focal en las piernas y los pies y/o afectación del tracto corticoespinal que a menudo contribuye a la alteración de la marcha. La ataxia, la disartria y la tetraparesia progresiva se desarrollan más tarde, junto con la atrofia óptica que conduce a la pérdida progresiva de la agudeza visual. El deterioro intelectual progresivo se ha descrito en la mayoría de las personas afectadas (115).

Enfermedad de Kufor-Rakeb

Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen *ATP13A2*, que se localiza en el cromosoma 1p36 y codifica para una ATPasa lisosomal del tipo 5-P en el cerebro. Esto puede provocar acumulación de proteínas tóxicas debido a fallos en la función lisosomal, lo que además provoca una sobrecarga de la ruta alternativa del proteasoma y compromete de esta forma la degradación de otras proteínas. El síndrome de Kufor-Rakeb también se llama enfermedad de Parkinson 9 o PARK9. (113)

Se caracteriza por parkinsonismo juvenil, demencia, signos piramidales, parálisis supranuclear de la mirada, mioclonos faciales, alucinaciones visuales y espasmos distónicos oculogíricos (115).

Neurodegeneración asociada a proteínas de la membrana mitocondrial (MPAN)

Esta enfermedad se debe a una mutación en el gen *C19orf12* que se encuentra en el cromosoma 19. Este gen, produce una pequeña proteína transmembrana cuya función se desconoce y se localiza en las mitocondrias. El gen *C19orf12* se encuentra relacionado con la biogénesis de los ácidos grasos y degradación de aminoácidos de cadena ramificada que están relacionados con procesos mitocondriales como son el metabolismo del CoA (118).

Las características definitorias de MPAN incluyen espasticidad que es más destacada que la distonía, atrofia óptica, neuronopatía motora con hallazgos tempranos de la neurona motora superior seguidos más tarde por signos de disfunción de las neuronas motoras inferiores, y un curso lentamente progresivo con supervivencia hasta la edad adulta. La gran mayoría de las personas con MPAN desarrollan un deterioro cognitivo progresivo. Otros hallazgos son paraparesia o tetraparesia y cambios neuropsiquiátricos. El inicio generalmente ocurre en la infancia hasta la edad adulta temprana con progresión lenta y supervivencia hasta la edad adulta (115).

Síndrome Woodhouse-Sakati

Este síndrome es causado por una mutación en el gen *DCAF17*. Puede actuar como posible receptor de sustrato para el complejo CUL4-DDB1 E3 proteína ubiquitina-proteína, aunque aún su función es desconocida (110). Los hallazgos neurológicos incluyen un trastorno extrapiramidal progresivo, distonía generalizada y distonía focal, disartria y deterioro cognitivo. Las anomalías endocrinas incluyen hipogonadismo, alopecia y diabetes mellitus (115).

Neurodegeneración asociada a la proteína β -propeller (BPAN)

Este síndrome es causado por una mutación en el gen WDR45, ligado al cromosoma X. También se sabe que está implicado en procesos de autofagia (119).

La neurodegeneración asociada a la proteína beta-propeller, también conocida como encefalopatía estática de la infancia con neurodegeneración en la adultez (SENDA). Las personas afectadas tienen retraso en el desarrollo global durante la infancia con ganancias motoras y cognitivas lentas; sin embargo, durante la adolescencia o la edad adulta, experimentan un inicio relativamente repentino de distonía progresiva, parkinsonismo y demencia (115).

Neurodegeneración asociada a CoA sintetasa (CoPAN)

Este síndrome es causado por mutaciones en el gen *CoASY* (*CoA synthase*), que codifica para una enzima mitocondrial bifuncional de 62 kDa, con actividades PPAT (*fosfopantetina adenililtransferasa*) y DPCK (*defosfo-CoA quinasa*) involucradas en las últimas dos reacciones de la síntesis del coenzima A.

La investigación en esta enfermedad aporta datos que apoyan la teoría de que la síntesis de CoA juega un papel fundamental en la patogénesis de NBIA y en el desarrollo y funcionalidad del sistema nervioso (113).

Se manifiesta con paraparesia espástica-distónica de inicio temprano y desarrollo posterior de distonía oro-mandibular, disartria, neuropatía axonal, parkinsonismo, deterioro cognitivo y comportamiento obsesivo-compulsivo.

Los individuos afectados tienen una progresión lenta y están vivos en su tercera década, aunque ya presentan dificultades al caminar (115).

Leucoencefalopatía con distonía y neuropatía motora

Este síndrome es causado por mutaciones en el gen SCP2 con localización en los peroxisomas. Desempeña su función en el metabolismo de los lípidos y remodelación de las membranas. Son de herencia autosómica recesiva.

Los individuos afectados presentan distonía y tortícolis espasmódica, ataxia espinocerebelosa, alteración de la marcha y del equilibrio (280).

Neurodegeneración asociada a CRAT

Esta neurodegeneración es causada por mutaciones en el gen CRAT con localización mitocondrial. Desempeña su función en el metabolismo de los lípidos y remodelación de las membranas. Son de herencia autosómica recesiva. Los individuos afectados presentan degeneración espinocerebelosa lentamente progresiva. Atrofia cerebelosa y leucodistrofia (280).

Neurodegeneración asociada a AP4M1

Esta neurodegeneración es causada por mutaciones en el gen AP4M1 con localización en el endosoma. Está asociada con tráfico de vesículas. Son de herencia autosómica recesiva.

Los individuos afectados presentan retraso en el desarrollo de inicio temprano y deterioro de la función motora, discapacidad intelectual (280).

Neurodegeneración asociada a REPS1

Esta neurodegeneración es causada por mutaciones en el gen REPS1 con localización citoplasmática y en el endosoma. Esta asociada al tráfico de vesículas. Son de herencia autosómica recesiva.

Los individuos afectados presentan hipotonía del tronco encefálico, ataxia cerebelosa progresiva, síndrome piramidal (280).

Neurodegeneración asociada a GTPBP2

Esta neurodegeneración es causada por mutaciones en el gen GTPBP2 con localización citoplasmática. Se desconoce su función. Son de herencia autosómica recesiva.

Los individuos afectados presentan atrofia cerebelosa, retraso mental, ataxia y distonía (280).

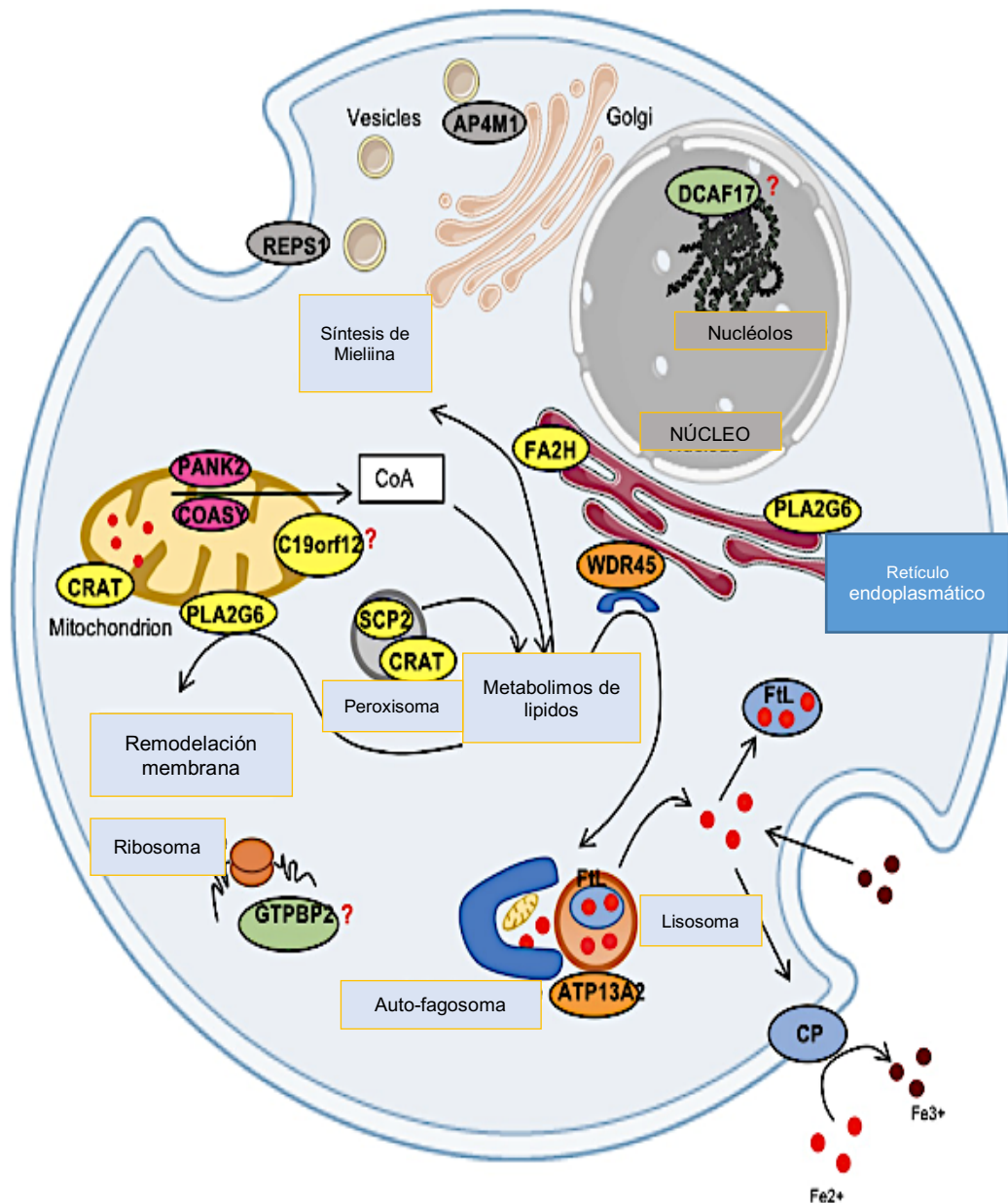
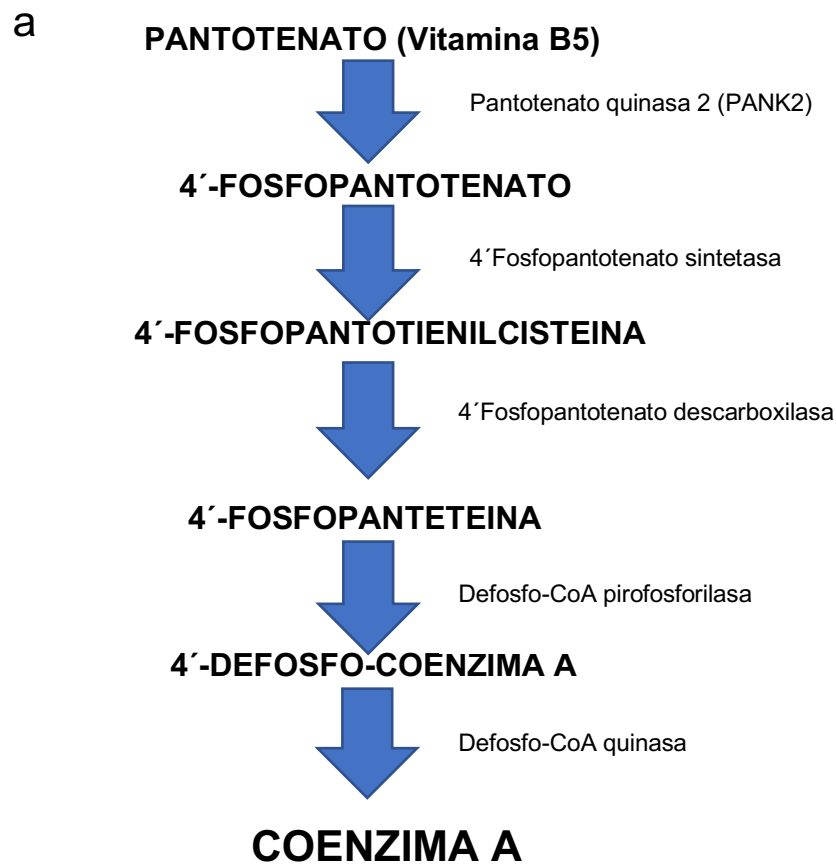


Fig 18: Representación esquemática de una célula que muestra los genes, las vías y los mecanismos fisiopatológicos para las NACH. Principales proteínas afectadas en las NACH. CP y FTL son reguladores importantes de la homeostasis celular del hierro. PLA2G6, FA2H, SCP2, CRAT, C19orf12 están involucrados en el metabolismo de los lípidos y la remodelación de la membrana. PANK2 y COASY son enzimas clave en la biosíntesis de CoA, que participa en una multitud de procesos celulares, incluida la síntesis de ácidos grasos. WDR45 y ATP13A2 juegan un papel en el proceso de degradación de la autofagia, REPS1 y AP4M1 están asociadas con el tráfico de vesículas, y las proteínas DCAF17 y GTPBP2 se desconoce su función (Adaptado 280).

En esta tesis se va a profundizar en el estudio de la neurodegeneración asociada a la Pantotenato quinasa (PKAN), así como los mecanismos moleculares que desencadenan esta patología y la búsqueda de tratamientos capaces de restaurar dichos defectos metabólicos. (113)

Neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa (PKAN)

Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen PANK2 que se localiza en el cromosoma 20p. Este gen codifica para la pantotenato quinasa 2, una enzima mitocondrial que regula la síntesis de CoA y cataliza la fosforilación del pantotenato (vitamina B₅) en la primera reacción de la ruta de síntesis de CoA, N-pantotenol-cisteína y pantetina. PKAN incluye aproximadamente el 50 % de los casos de NACH (Figura I9).



b

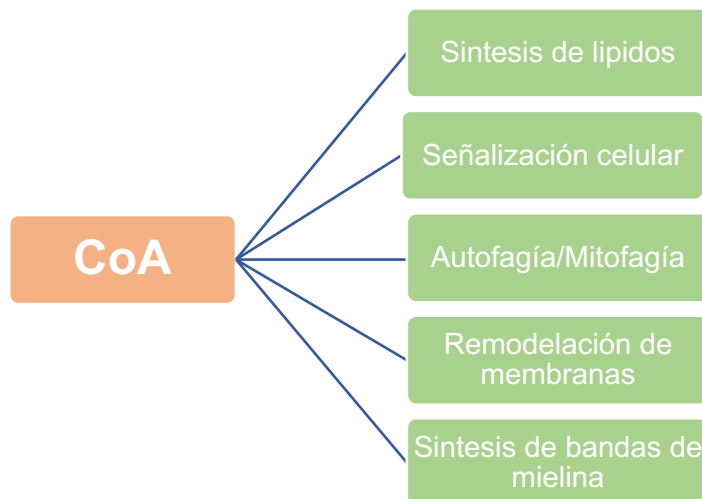


Figura I9. Esquema ilustrativo de la ruta de síntesis del Coenzima A. En la figura I9a se puede observar como PANK2 actúa en dicho proceso, catalizando la transformación del pantotenato a 4'-fosfopantotenato (primer paso de la ruta) hasta la formación del Coenzima A. Igualmente se pueden observar algunas de las principales funciones de la Coenzima A. (120)

Hay dos hipótesis principales que intentan explicar las alteraciones patológicas asociadas a una disminución de los niveles de PANK2. La primera es que se produce a una acumulación de sustratos neurotóxicos que contienen cisteína en las regiones con mayor demanda energética, como son los ganglios basales, debido a la inhibición de la síntesis de CoA. Los excesos de cisteína quelan el hierro y forman un compuesto que provoca daño tisular al promover estrés oxidativo celular (120). Y la segunda se corresponde con una deficiencia mitocondrial de CoA que provoca un aumento del estrés oxidativo por los radicales libres (121).

Las partes más afectadas por la enfermedad engloban los ganglios basales y centros del control del movimiento, por lo que las disfunciones incluyen distonía, rigidez articular o coreoatetosis. Además se produce una acumulación de hierro en el cerebro y hay presencia de esferoides axonales, que son engrosamientos del axón característicos que en este caso están limitados al sistema nervioso central (122).

Clasificación y síntomas de PKAN

Se ha clasificado la enfermedad en función de la edad de inicio de los síntomas, de forma que se habla de PKAN clásica si el inicio es sobre los 3 ó 4 años de vida o PKAN atípica si se produce en la segunda o tercera década de la vida.

PKAN clásica

La forma clásica se relaciona con una progresión rápida de los síntomas y un gran deterioro, lo que provoca el fallecimiento de los pacientes entre la segunda y tercera década de vida (123). Además, se describe que el progreso es de forma no uniforme, alternando periodos de deterioración marcada que pueden durar uno o dos meses, con largos periodos de estabilidad clínica. Las mutaciones del gen encontradas en estos pacientes suelen provocar truncamientos de la proteína PANK2.

Los síntomas más frecuentes en estos pacientes están relacionados con las dificultades posturales o en la marcha. Aunque los principales síntomas neurológicos son disfunciones extrapiramidales, incluyendo distonía prominente, disartria, rigidez y coreoatetosis. La distonía es bastante común en los pacientes al inicio de la enfermedad y puede incluir a la musculatura craneal y perjudicar la integridad física. Además, se puede dar parkinsonismo, acantocitosis, deterioro cognitivo y demencia. Puede haber pérdida de la capacidad de andar durante los 10-15 años posteriores al inicio de la enfermedad.

Otras características comunes incluyen la espasticidad del tracto corticoespinal, hiperreflexia y signos patológicos del dedo del pie extensor y evidencias clínicas o electroretinográficas de retinopatía pigmentaria (120, 123).

PKAN atípica

La forma atípica es muy heterogénea, tanto que incluso en casos raros hay pacientes que tienen problemas inespecíficos a edades tempranas, entre los que se puede incluir retraso en el desarrollo. Al comienzo de la enfermedad son frecuentes los trastornos del habla y problemas psiquiátricos (123),

presentándose parkinsonismo como primer signo. Las mutaciones que se encuentran del gen en estos pacientes suelen ser de cambio de aminoácido y comprometen la actividad de la proteína.

Se relaciona con una progresión más lenta y síntomas menos intensos que aquellas personas que padecen la forma clásica, con características extrapiramidales menos graves, distonía y rigidez menos severa y, como ya se ha dicho, con una progresión más lenta. Son comunes algunos signos de afectación del tracto corticoespinal como la espasticidad o la hiperreflexia.

También se ha descrito que se pueden desarrollar dificultades en el habla, incluyendo palilalia (repetición de palabras o frases con atraso) y disartria.

La mayoría de los pacientes son capaces de andar en la edad adulta pero los hay que pierden la capacidad de moverse de forma independiente. La evidencia clínica de retinopatía o atrofia óptica es mucho menos común que en pacientes con la enfermedad clásica.

Al contrario que en PKAN clásica, donde son muy raros, en la variante atípica se incluyen de forma prominente problemas psiquiátricos con deterioro cognitivo, reminiscencia o demencia frontotemporal. Algunos de los problemas son la aparición de cambios de personalidad con impulsividad, estallidos de violencia, depresión, síntomas obsesivo-compulsivos e inestabilidad emocional. También se han descrito síntomas psicóticos y leves alteraciones del sueño (120, 123).

Diagnóstico

El primer criterio de diagnóstico utilizado para PKAN fue propuesto por Elizabeth Dooling y colaboradores en 1974, y se basaba en características clínicas. Kenneth Swaiman en 1991 y 2001 revisó estos criterios tras la validación de las imágenes por resonancia magnética (MRI) como herramienta de diagnóstico ya que permite demostrar de forma no invasiva la disminución del tiempo de relajación de T2 causada por los depósitos de hierro.

Además, en los pacientes con PKAN se muestra un patrón específico en la MRI, conocido como “ojo del tigre” (Figura I10), descrito por primera vez por Kapil Sethi y colaboradores en 1988. Se trata de una señal de alta intensidad en el centro del globo pálido interno, debida a necrosis y a edema, y una señal de baja intensidad en la región que le rodea, que representa el exceso de los depósitos de hierro (120).

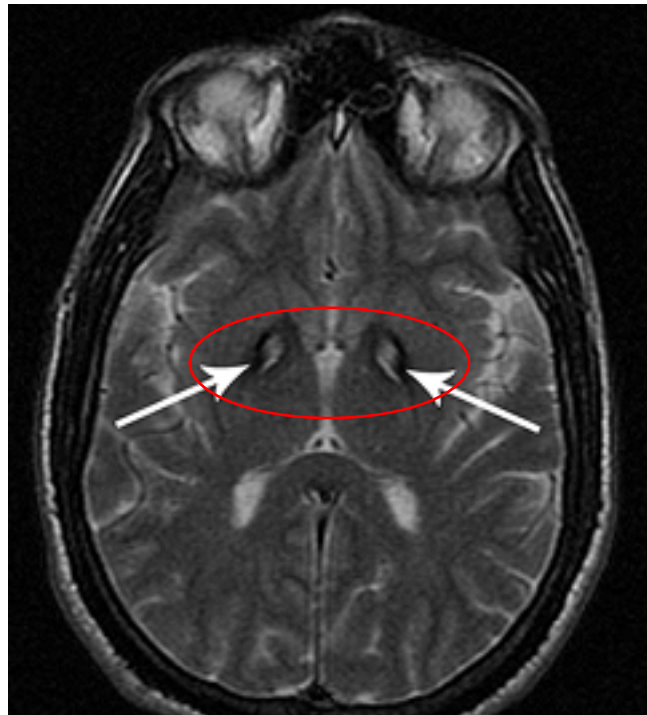


Figura I10: Patrón específico, “ojo del tigre”, mostrado en la MRI de pacientes PKAN. En la imagen se puede apreciar la acumulación de hierro en el globo pálido este paciente tras un estudio por imagen de Resonancia Magnética. (Adaptado 120)

Estos cambios apreciados en la MRI pueden preceder al inicio clínico de la enfermedad. En las etapas iniciales de PKAN sólo se pueden observar señales de alta intensidad aisladas en imágenes ponderadas en T2 del globo pálido, mientras que en etapas posteriores de la enfermedad sólo se observa hipointensidad en el globo pálido, lo que puede explicarse por una mayor acumulación de depósitos de hierro que oscurecerían la zona central de hiperintensidad.

Estudios determinaron que existe una correlación absoluta entre el signo del “ojo del tigre” y la presencia de mutaciones en PANK2. Este signo también se ha observado en otro tipo de enfermedades, por lo que deben tenerse en cuenta el

contexto de los datos clínicos y de las pruebas realizadas antes de realizar un diagnóstico específico, aunque esta prueba permite acotar el diagnóstico de forma no invasiva (120).

En un estudio reciente, el “ojo del tigre” se ha identificado como una región ovoide en el globo pálido que carece de neuronas viables, pero que es rica en grandes esferoides, lo que concuerda con la degeneración neuronal, y pequeños esferoides compuestos de axones distróficos. Los estudios con MRI en pacientes presintomáticos de PKAN pueden apoyar la posibilidad de que la pérdida neuronal precede a la acumulación de hierro y que esta acumulación sea un efecto secundario (116).

Actualmente también se realiza un diagnóstico a nivel genético molecular ya que en los 7 exones de PANK2 se han detectado mutaciones (normalmente de pérdida de sentido), duplicaciones, deleciones y mutaciones en sitios de *splicing*.

Las mutaciones en PANK2 se dan en todos los casos de PKAN clásica, especialmente en los que se muestra el “ojo del tigre” en MRI, y aproximadamente en un tercio de los pacientes de PKAN atípica. En los primeros las mutaciones suelen provocar proteínas truncadas mientras que en los segundos se producen cambios de aminoácidos, lo que indicaría que muchos de los pacientes con la forma atípica de la enfermedad pueden tener una actividad residual de la enzima (125).

Las dos mutaciones más frecuentes, 1231G→A y 1253C→T, se corresponden aproximadamente con un tercio de los casos de PKAN, mientras que la mayoría de las restantes son mutaciones provocadas esporádicamente (Tabla I1)

Si en una familia afectada se ha descrito previamente, puede realizarse un diagnóstico prenatal mediante análisis de las células por amniocentesis o por muestreo de vellosidades coriónicas. Incluso puede plantearse un diagnóstico preimplantacional si se conoce la mutación causante de la enfermedad en la familia. Esto es aplicable a casi todos los tipos de NACH.

Tabla I3. Localización de las mutaciones causantes de PKAN en cDNA de PANK2 (137-138).

Mutación	Cambio proteico	PKAN típica	PKAN atípica	Observaciones
71A→G	E24G	+		
118C→T	Q40X	+		Homocigosis
215insA	Frame shift	+		Homocigosis
239insA	Y80X	+		Homocigosis
240C→G	Y80X	+		
243del	Frame shift	+		
285del	Frame shift		+	
326G→T	G109V		+	
370A→G	T124A		+	
398T→A	M111K		+	
416G→C	R139P	+		
445G→T	E149X		+	
448C→T	Q150stop	+		
460C→T	R154W	+		
493-494del	Frame shift	+		
502C→T	R168C		+	
503G→T	R168L	+		
514C→G	L172V	+		
526C→T	R176C	+		Homocigosis
545insA	Frame shift	+		
569insA	Y190stop	+		
573del	Frame shift	+		
597-603del	Frame shift	+		Homocigosis
606T→A	C202X	+		Homocigosis
635A→G	E212G	+		
636G→T	E212D		+	
650C→T	T217I	+		Homocigosis
656G→T	G219V		+	
695C→G	D232G		+	Homocigosis
700A→G	T234A		+	
700A→T	K234X	+		
721T→C	S240P		+	Homocigosis
734A→G	N245S		+	
740G→A	R247Q			
745C→T	R249W			
755-758del	Frame shift	+		
790C→T	R264W	+		
794-822del	Frame shift	+		
803A→G	D268G		+	
846-847del	Frame shift	+		Homocigosis
856C→T	R286C	+	+	
862G→A	A288T	+		
881A→T	N294I		+	

908T→C	L303P	+		
927-933del	Frame shift	+		
943-945del	L315del	+		
953G→A	C318Y	+		
970G→T	D324Y		+	
1009G→A	D337N	+		
1021C→T	R341X	+		
1051T→C	S351P		+	
1082G→A	S361N	+		Homocigosis
1133A→G	D378G		+	
1160T→C	I387T	+		
1169A→T	N390I	+		Homocigosis
1171-1174dup	Frame shift	+		Homocigosis
1172T→A	I391T		+	
1176-1177del	V394stop	+		
1193C→T	A397V		+	
1196C→T	A399V	+		
1201A→G	N401D	+		
1211A→T	N404I		+	
1231G→A	G411R	+	+	
1253C→T	T418M	+	+	Homocigosis
1264C→T	R422W	+		
1323-1326del	Frame shift	+		
1351C→T	R451stop	+	+	
1355A→G	D452G		+	
1358T→C	L453P	+		
1379C→T	P460L		+	
1391C→T	P464L			
1411A→G	R471G		+	
1432G→A	S471N	+		
1499A→T	N500I	+		
1501-1504dup	Frame shift	+		
1510A→G	I504V		+	
1526C→T	A509V	+		
1555T→C	F519L		+	
1594C→T	R532W	+		
1607A→G	Y536C		+	
IVS1-1G→A	Aberrant splicing	+		
IVS1-2A→T	F377S		+	
IVS2+3A→G	Aberrant splicing	+		
IVS4-1G→T	Aberrant splicing	+		
IVS5-3C→G	Aberrant splicing	+		Homocigosis
IVS6-2A→G	Aberrant splicing	+		

Tratamiento

La mayoría de los tratamientos para las NACH son sintomáticos por lo que normalmente se trata de forma farmacológica la espasticidad y las convulsiones, la distonía o los trastornos psiquiátricos.

La mayoría de los pacientes con NACH, incluyendo aquellos con PKAN, no responden bien a la administración de levodopa/carbidopa. Se trata de un precursor de la dopamina junto a un inhibidor de la dopamina descarboxilasa que impide la descarboxilación de la levodopa hasta que cruza la barrera hematoencefálica, donde es descarboxilada a dopamina y estimula los receptores dopaminérgicos. Es utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y en el parkinsonismo sintomático, provocando un alivio de los síntomas y permitiendo que el cuerpo realice movimientos normales, mejorando incluso el control muscular (126). Como se ha visto, en PKAN son varios los trastornos del movimiento observados, por lo que es lógico que se probara este tipo de fármaco que se sabe que es efectivo en otras enfermedades, aunque la falta de beneficio al paciente, excepto en casos aislados, puede deberse a que los mecanismos de ambas enfermedades sean muy diferentes y no se sitúa como tratamiento de referencia.

También se han probado otros fármacos que reducen los movimientos anormales y la espasticidad como las benzodiacepinas, anticolinérgicos, baclofen, neurolépticos típicos y atípicos, inyecciones de la toxina botulínica para la distonía focal y baclofen intratecal para la distonía significativa. Por otro lado, la estimulación profunda cerebral (*Deep Brain Stimulation*, DBS) del *globo pálido* interno puede producir algún beneficio en el tratamiento de la distonía, pero los resultados son variables (120).

Igualmente se han evaluado los tratamientos con agentes quelantes de hierro, que se unen a este y permiten su eliminación. Algunos tratamientos con quelantes se han mostrado eficaces, pero los ensayos han sido limitados y los cambios no han sido lo suficientemente significativos a nivel clínico. Es el caso de la deferiprona, un compuesto obtenido mediante síntesis química y del que

son necesarias tres moléculas para unirse a un átomo de hierro, o de la deferoxamina, un sideróforo que se obtiene de *Streptomyces pilosus* y que se combina en el organismo con el hierro férrico de los depósitos formando un complejo estable e hidrosoluble (127). A pesar de la aparente eficacia en algunos casos, el mayor problema de los agentes quelantes son sus efectos secundarios, que pueden ser bastante serios, pudiendo provocar una disminución de calcio en la sangre, arrastrar vitaminas durante la eliminación del metal e incluso provocar daños renales y hepáticos.

Normalmente también es necesario aplicar cuidados de tipo adaptativo o de asistencia como los servicios para ciegos, los programas educativos especiales, los dispositivos de asistencia a la comunicación o las ayudas para las alteraciones de la marcha (como andadores o sillas de ruedas). Según el caso, se tiene en cuenta la prevención de complicaciones secundarias que pueden derivar de una inadecuada alimentación, llegando incluso a la alimentación mediante sonda gastrostomía. Es importante que haya una vigilancia frente a los dolores tratables durante episodios extremos de distonía, monitorizando el peso y la altura, con una evaluación oftalmológica de rutina y con evaluaciones periódicas de deambulación y habilidades del habla (113).

Mecanismos moleculares implicados en la patología

Este tipo de patología como se ha mencionado anteriormente, se asocia a defectos en el gen que codifica para la enzima PANK2, enzima esencial para la síntesis del Coenzima A (128).

También se ha confirmado que los niveles de CoA pueden verse afectados en situaciones de estrés, alcoholismo, diabetes y en algunos tumores (128).

Coenzima A

El coenzima A (CoA) es una coenzima de transferencia de grupos acilo que participa en diversas rutas metabólicas (ciclo de Krebs, síntesis y oxidación de ácidos grasos). Se deriva de una vitamina, el ácido pantoténico (vitamina B5), y es una coenzima libre.

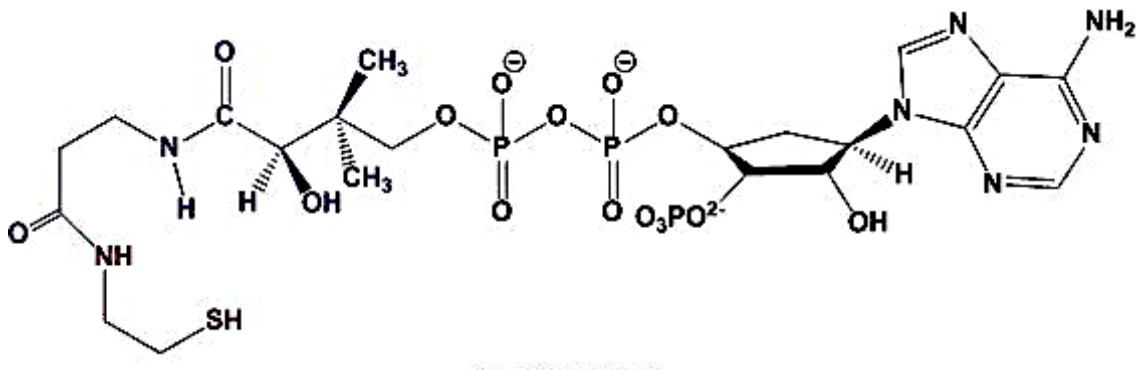


Fig I11: Estructura de la coenzima A. El Coenzima-A es un transportador de grupos acilo. Éstos, los grupos acilo, juegan un papel trascendente tanto en procesos catabólicos (β -oxidación de los ácidos grasos), como anabólicos (síntesis de lípidos de membrana). En ambos casos, se forma un intermediario tioéster entre el grupo acilo y el grupo sulfhidrido de la molécula de Coenzima-A.

Desde el primer descubrimiento del CoA por Fritz Lipmann en 1945 como parte de sus estudios sobre acetilación biológica, ha quedado claro que esta molécula podría ser uno de los cofactores enzimáticos más ampliamente utilizados. Se conoce como cofactor metabólico esencial para todos los organismos vivos, que se encuentra implicado en más de 100 reacciones metabólicas, como el ciclo del ácido cítrico, la síntesis de colesterol y esfingolípidos o el metabolismo de los ácidos grasos, y además es esencial para la síntesis de acetil-CoA a partir de citrato o acetato. No es sólo una molécula clave en el metabolismo, sino que también modula el epigenoma y activa al menos una kinasa específica. La influencia de esta molécula en la salud y la enfermedad es mucho mayor de la que se creía previamente (129), incluso se ha estimado que aproximadamente

el 4% de todas las enzimas conocidas utiliza de forma obligada CoA como cofactor (128).

Se sabe que el CoA se encuentra compartimentalizado y altamente regulado en todos los eucariotas, según estudios consultados las concentraciones citosólicas de CoA en tejidos de mamíferos se estiman entre 0.02-0.14 mM o 0.1-0.4 mM, mientras que las concentraciones mitocondriales son mayores, entre 2-5 mM o 1-4 mM (129).

Tras la identificación en el año 2001 del gen causante de la PKAN, se observó que los niveles de CoA esaban directamente relacionados con las alteraciones de este gen. De esta forma, las mutaciones en el gen PANK2 provocan descensos significativos de los de los niveles de CoA en los pacientes. Sin embargo también se ha observado que las alteraciones en la biosíntesis del CoA, también afecta a los niveles de otros metabolitos como el Acetil-CoA, involucrado en la acetilación de las proteínas.

La ruta biosintética del coenzima A

La síntesis de CoA consta de cinco pasos con enzimas específicas y altamente conservadas, habiéndose identificado los genes que codifican para estas enzimas en varios organismos. El sustrato inicial de la reacción es el ácido pantoténico o vitamina B₅, un micronutriente que se presenta en cantidades suficientes en la dieta y que además es producido por bacterias en el intestino humano (129). Es requerido para iniciar la secuencia de cinco reacciones enzimáticas que tienen lugar en el citosol y en el espacio intermembrana mitocondrial y que llevan a la síntesis de coenzima A.

Para que estas reacciones se puedan llevar a cabo, primero debe introducirse el ácido pantoténico en el interior celular a través de una proteína de transporte asociada a membrana, SLC5A6 (SMVT), que media en la captación de una molécula de pantotenato y dos iones de sodio desde el espacio extracelular hasta el citosol. Esta misma proteína es la que media en la captación de biotina y lipoato.

A continuación, se describe la sucesión de reacciones de la ruta biosintética (128, 131):

- **Fosforilación del ácido pantoténico a fosfopantotenato**

Esta reacción está catalizada por la PANK2, que utiliza ATP como donador del grupo fosfato. La localización de esta enzima se ha establecido en el espacio intermembrana mitocondrial.

Este primer paso regula la síntesis de CoA, que está controlado por los propios niveles de CoA y de sus tioésteres, los productos finales de la ruta. Esta regulación por retroalimentación de PANK2 controla toda la disponibilidad de CoA en respuesta al estado metabólico celular.

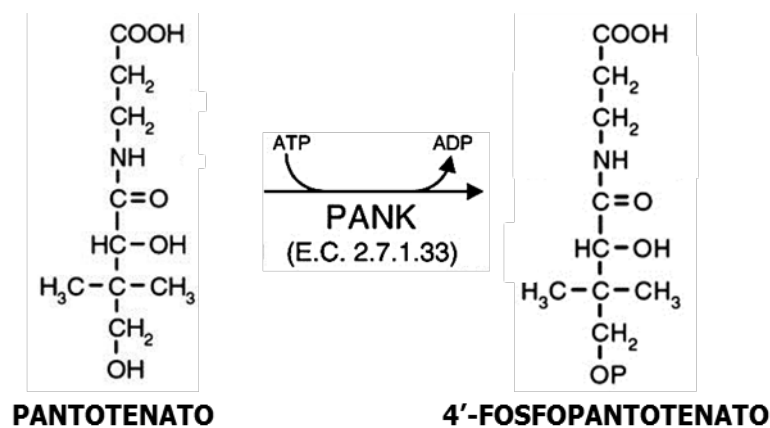


Figura I12. Primera reacción para la síntesis de CoA. Fosforilación del ácido pantoténico a fosfopantotenato

- **Conjugación de 4'-fosfopantotenato con cisteína (Cys) acoplada a la conversión de ATP hasta AMP.**

Esta reacción la lleva a cabo la fosfopantotenato-cisteína ligasa citosólica (PPCS) y tiene como resultado la formación de 4'-fosfopantotenolcisteína (PPC).

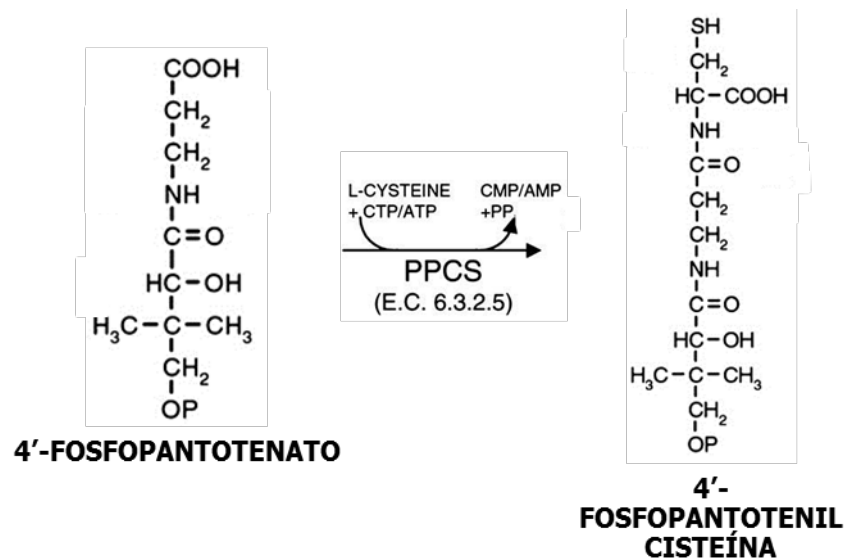


Figura I13. Segunda reacción para la síntesis de CoA. Conjugación de 4'-fosfopantotenato con cisteína (Cys) acoplada a la conversión de ATP hasta AMP.

- **Decarboxilación de 4'-fosfopantotenolcisteína (PPC) hasta 4'-fosfopantetina (PPANT).**

Mediada por la fosfopantotenolcisteína decarboxilasa (PPCDC), enzima homotrimérica citosólica a la que se une a un cofactor FMN por subunidad. Se ha observado la existencia de una segunda isoforma que carece del dominio de unión a FMN y que parece no ser funcional.

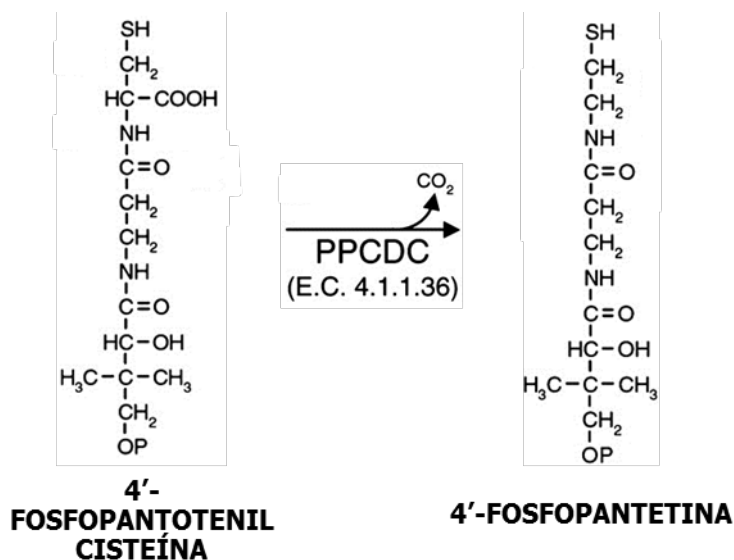


Figura I14. Tercera reacción para la síntesis de CoA. Decarboxilación de 4'-fosfopantotenolcisteína (PPC) hasta 4'-fosfopantetina (PPANT).

- **Transferencia de un grupo adenilil, adenilación, desde ATP hasta 4'-fosfopantetina (PPANT).**

Catalizada por la fosfopantetina adenililtransferasa (PPAT) que permite la formación de defosfo-coenzima A (DP-CoA).

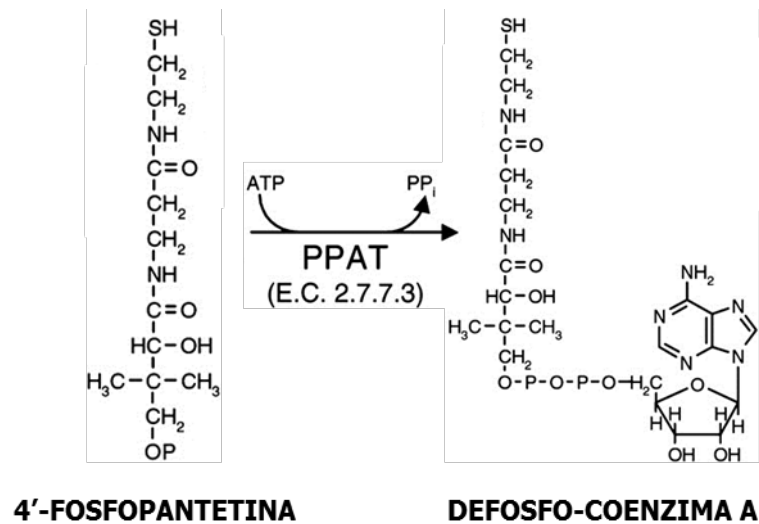


Figura I15. Cuarta reacción para la síntesis de CoA. Adenilación desde ATP hasta 4'-fosfopantetina (PPANT).

- **Fosforilación de DP-CoA** para dar lugar a la Coenzima A (CoA-SH) por la defosfo-CoA quinasa (DPCK), enzima localizada en la membrana mitocondrial externa.

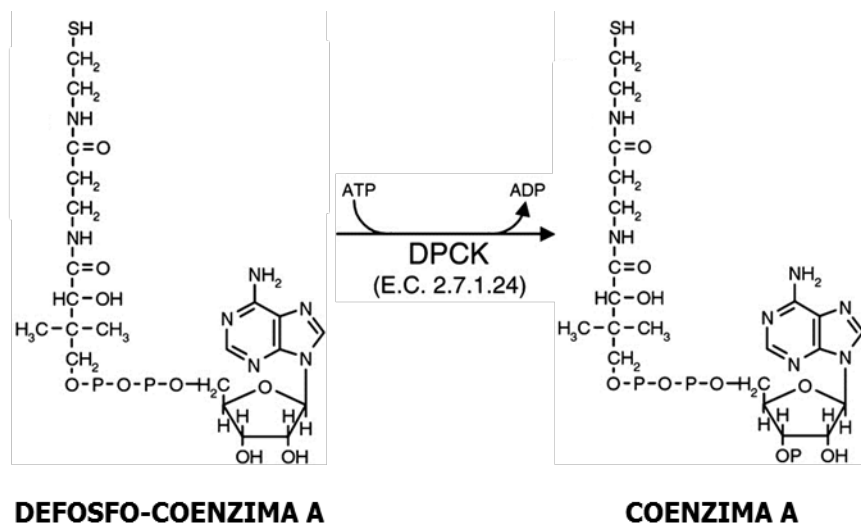


Figura I16. Quinta reacción para la síntesis de CoA. Coenzima A producido desde el defosfo-CoA quinasa

Los dos últimos pasos de la ruta, en mamíferos, están catalizados por la enzima coenzima A sintetasa bifuncional (COASY), cuyas dos actividades se explican con anterioridad. Esta enzima puede actuar como punto de regulación de la biosíntesis de CoA.

Relación del CoA con las PANK

La familia de genes de la pantotenato quinasa codifica para cuatro proteínas con distintos patrones de expresión y localizaciones celulares: PANK1 con las isoformas PANK1 α y PANK1 β que surgen del inicio alternativo en la transcripción del gen PANK1, PANK2, PANK3 y PANK4. A pesar de la existencia de varias proteínas PANK sólo las mutaciones producidas en PANK2 son causantes de PKAN.

Acetil-CoA es un potente inhibidor de las isoformas de PANK de mamíferos al unirse al sitio alostérico que abarca la interfaz del dímero proteico (Figura I17). La unión de acetil-CoA mantiene el sitio de unión del sustrato en una conformación abierta, con lo que impide que se complete la reacción de la quinasa (130). PANK1 β es la menos sensible a la retroinhibición por acetil-CoA, con un IC₅₀ de 5 μ M, mientras que PANK2 y PANK3 son inhibidas con una concentración mucho menor, con IC₅₀ 0.1 μ M y 1 μ M respectivamente. Estas enzimas no estarán activas en condiciones fisiológicas asociadas a niveles altos de acetil-CoA.

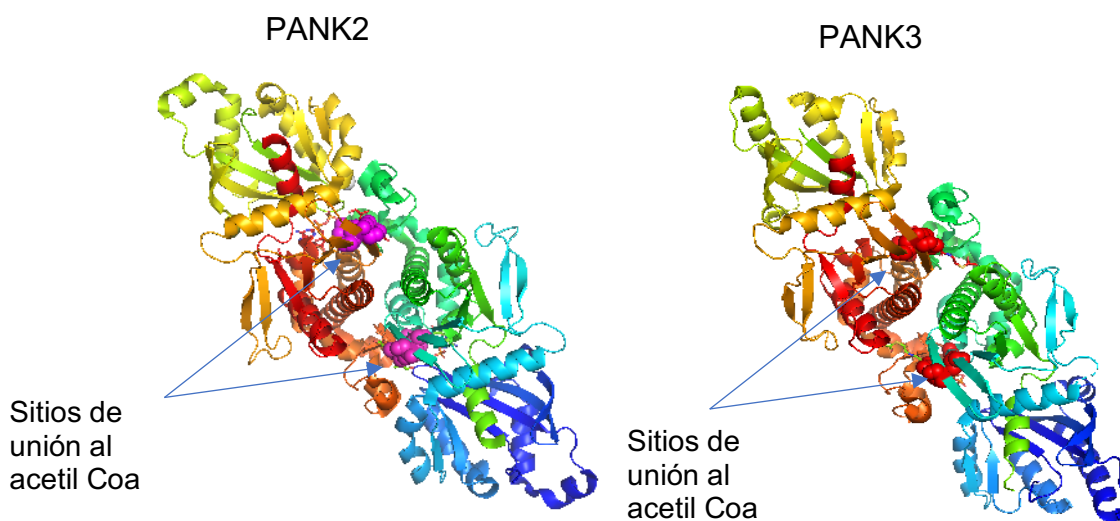


Figura I17. Estructura tridimensional de PANK2 y PANK3. En la imagen de la izquierda se puede ver a la PANK2 unida a acetil-CoA y en la imagen de la derecha a la PANK3 unida al acetil-CoA, ambas mostrando sus sitios de unión específicos. Dicha imagen fue realizada mediante el sistema bioinformático Pymol.

PANK1 se expresa en el corazón, hígado y riñón. La isoforma PANK1 α se localiza exclusivamente en el núcleo, mientras que PANK1 β se localiza en el citosol y se asocia con vesículas cubiertas de clatrina y endosomas de reciclaje.

PANK2 es la única que se presenta tanto en mitocondria como en núcleo, es expresada de forma ubicua, incluyendo la retina y el ganglio basal infantil. PANK3 aparece de forma más abundante en el hígado, y se localiza únicamente en el citoplasma. PANK4 parece no ser activa enzimáticamente (117).

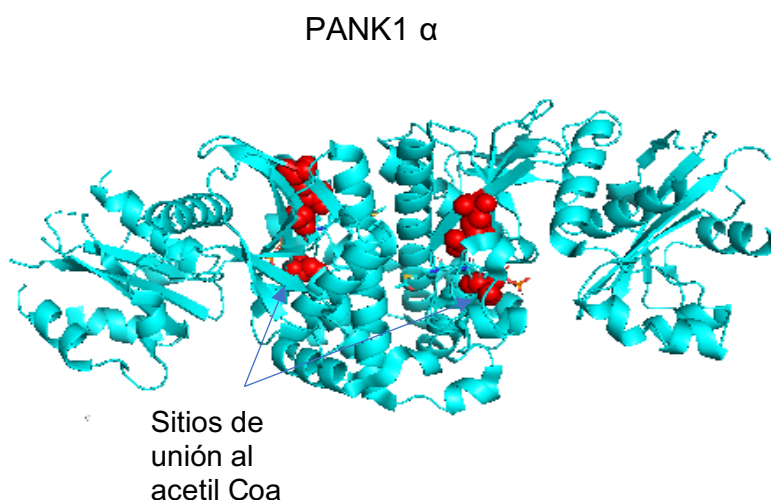


Figura I18. Estructura tridimensional de PANK1 α . La proteína PANK1 unida a acetil-CoA mediante sitios específicos de unión. Dicha imagen fue realizada mediante el sistema bioinformático Pymol.

La localización mitocondrial de PANK2 se ha situado en el espacio intermembrana, lo que es consistente con la hipótesis de que la acil-carnitina contrarresta la inhibición por acetil-CoA (130). La carnitina es una amina cuaternaria que se sintetiza en el hígado, en los riñones y en el cerebro a partir de lisina y metionina, es la responsable del transporte de ácidos grasos al interior

de las mitocondrias gracias a la formación de acilcarnitina de cadena larga que tiene lugar en el espacio intermembrana al interceptar y transferir grupos acilo desde el CoA citosólico al mitocondrial. Estas acilcarnitinas son activadores de PANK2 y PANK3.

Cabe destacar la existencia de hipótesis que establecen que las diferentes localizaciones subcelulares de las isoformas de PANK permiten su actuación como sensores metabólicos que modulan su actividad enzimática, con lo que modulan la síntesis de CoA en respuesta al metabolismo de los diferentes compartimentos (130).

Respecto al procesamiento de la proteína humana completa PANK2 se ha descrito que se corta por dos sitios mediante una peptidasa mitocondrial de procesamiento, generando una proteína de tránsito de 59.2 kDa a modo de intermediario y una proteína madura de vida larga de 47.4 kDa (116). Las secuencias mitocondriales objetivo se localizan en ambos péptidos, habiéndose confirmado la actividad bioquímica de la proteína de 48 kDa. Las investigaciones sugieren que hay dos transcritos diferentes que codifican para dos isoformas de la proteína, estando la isoforma de PANK2 más larga localizada en la mitocondria (116).

Disminución de los niveles de Coenzima A

Los bajos niveles de CoA, produce una baja protección neuronal, siendo esta más sensible a los daños oxidativos. Un fallo en los niveles de CoA, conlleva a alteraciones en la biosíntesis celular, daños oxidativo y alteraciones en el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa.

La acumulación de ROS se ve aumentada debido a los depósitos de hierro y de cisteína, ya que los iones ferrosos pueden reaccionar con oxígeno y formar peróxido de hidrógeno y radicales superóxido. Estos mismos iones también pueden reaccionar con el peróxido de hidrógeno y generar radicales de hidroxilo libres altamente reactivos. Estos incrementos de ROS aumentan la susceptibilidad de las regiones a sufrir sus efectos nocivos y la peroxidación

lipídica afectará a las membranas y activará la apoptosis. La cisteína se auto oxida fácilmente en presencia de hierro, con lo que también aumenta la cantidad de radicales libres.

Debido a la habilidad de producir ROS, el aumento de los niveles de hierro se relaciona directamente con la neurotoxicidad por la inducción de estrés oxidativo, que conduce a la muerte neuronal. Además, la producción de este tipo de neurodegeneración está acompañada por efectos como la producción de aldehídos reactivos por la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de membrana, la generación de funciones carbonilo por modificaciones postranscripcionales de proteínas debido tanto a aldehídos reactivos como a ROS (con el consecuente daño a proteínas) y la agregación de proteínas mal plegadas que se agrupan en cuerpos de inclusión intracelulares (117).

La afectación a la oxidación de los ácidos grasos se debe a la necesidad de que haya un exceso de CoA que actúe como aceptor para los grupos acetato que se liberan en el proceso oxidativo. Durante la oxidación de los ácidos grasos se produce acetyl-CoA y NADH, siendo este último un cofactor necesario para la gluconeogénesis, por lo que indirectamente podría haber otras afectaciones. Parte de la información expuesta anteriormente se ha utilizado para la proposición de vías para la explicación de daños neuronales en los pacientes, considerando el déficit de PANK2 como defecto genético y la acumulación de hierro como efecto secundario del defecto. A pesar de ser un fenómeno secundario, se ha considerado que es el mecanismo que más contribuye a la patogénesis de la enfermedad (114).

Es interesante señalar los resultados de la realización de perfiles metabólicos en pacientes con PKAN ya que se ha demostrado un incremento en los niveles de lactato (que junto al aumento de ROS podría sugerir la existencia de disfunción mitocondrial), reducción de biosíntesis de lípidos y colesterol y daños en el metabolismo de los ácidos biliares. Aunque es significativo que algunas investigaciones sugieran que las contracciones musculares que sufren los

pacientes podrían ser las causantes del incremento de los niveles de lactato (132).

Acetilación del CoA

El coenzima A es necesario para la síntesis de acetil-CoA, que es el principal donador de grupos acilo a los residuos de lisina de las proteínas mediante una reacción mediada por aciltransferasas. Esta acetilación es una modificación postranscripcional con una gran influencia en la función proteica. Sin embargo, la influencia concreta de los niveles de CoA en la acetilación de proteínas es desconocida, aunque se ha demostrado que estos niveles afectan al estado de acetilación de las proteínas (133).

Las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs) representan dos clases enzimáticas que, respectivamente, catalizan en uno u otro sentido la reacción cinética de la acetilación de residuos de lisina en sustratos específicos de proteínas (134). Existe un equilibrio muy estrecho entre las acetiltransferasas y las deacetilasas que es bien conocido como factor determinante para el estado de acetilación de proteínas. Tanto en la acetilación como en la deacetilación, la reacción se produce por la unión a la cola NH_3^+ del grupo acetil proveniente de la acetil-CoA o por quitar el grupo acetil de la lisina hasta el CoA, respectivamente. Al producirse la unión en esta posición la carga de la proteína se ve afectada, eliminándose la carga positiva de la lisina (135).

Entre los sustratos más importantes de HATs y HDACs se encuentran las histonas nucleosomales y varios factores de transcripción que forman parte del complejo de inicio de la transcripción. Las histonas son paquetes de proteínas muy alcalinas alrededor de los que se enrolla el DNA, lo que permite que se almacene de una forma ordenada. La acetilación y desacetilación de las histonas es esencial para la regulación génica.

HATs modifica las colas de las histonas del núcleo mediante acetilación post-translacional, de forma que se crea un “código de histonas” que permite la modificación de la cromatina y aumenta la accesibilidad al DNA de los factores

de transcripción. La acetilación de las histonas disminuye su afinidad con la cadena de DNA, que se encuentra cargada negativamente, con lo que la hebra se afloja, además se aumenta la estabilidad de proteínas y puede aumentar el potencial de transactivación, lo que también facilitaría las interacciones con el DNA y otras proteínas del aparato transcripcional (134). Contrariamente, HDACs disminuye el proceso de transcripción en un punto concreto mediante la desacetilación.

En conjunto, el sistema HAT-HDAC es uno de los últimos interruptores de la regulación de la expresión génica debido a la participación en la maquinaria regulatoria de las histonas y la transcripción. Además de la regulación transcripcional, este sistema también se ha postulado para la modulación otros procesos asociados a la cromatina como la replicación, la recombinación específica de sitio y la reparación del DNA, de modo que juega un papel mucho más grande en la modulación del destino celular.

Relación entre acetilación y CoA

La experimentación en modelos animales ha permitido conocer más datos respecto a la acetilación y los niveles de CoA. Tanto en el caso de mutantes para la acetil-CoA sintetasa de *Saccharomyces cerevisiae* como en los mutantes por inactivación del ortólogo de AMPK (AMP-activated protein kinase) en la levadura, se ha visto que hay un descenso en los niveles de acetilación de las histonas, además en el segundo tipo se ha observado una reducción de la aptitud y resistencia al estrés.

Por otro lado, se ha demostrado que la manipulación de los niveles de CoA puede influir en los niveles de acetilación de proteínas mediante la observación del descenso de los niveles de CoA con *Drosophila* como modelo. Los experimentos se realizaron mediante una baja regulación en estos animales de *dPANK/fbl* utilizando silenciamiento por RNA interferente (RNAi), con el uso de HoPAN (inhibidor químico de PANK) y en moscas mutantes en *dPANK/fbl*, en todos los casos se ha relacionado el descenso de los niveles de CoA con un descenso en los niveles de acetilación de histonas y tubulina, por lo que no hay

un mecanismo de compensación capaz de mantener la acetilación normal. Observándose también que la restitución de los niveles de CoA revierte el fenotipo. Todos estos datos en conjunto indican el fuerte vínculo existente entre CoA y/o acetil-CoA en la regulación de la acetilación en proteínas específicas (129).

Relación entre neurodegeneración y la disminución de la acetilación de histonas y tubulinas

En condiciones normales existe un equilibrio entre la concentración proteica y la actividad enzimática de HATs y HDACs, en el que las moléculas activas adecuadas de cualquiera de los grupos están presentes para la regulación efectiva de la acetilación de la cromatina y los factores de transcripción de forma controlada. Con este equilibrio se pone de manifiesto la homeostasis neuronal y la importancia de la regulación en la expresión génica para la actividad neurológica normal, por lo que cualquier alteración del equilibrio puede conducir a problemas inesperados (134).

Se ha visto que la ruptura del equilibrio HAT-HDAC se debe a una pérdida de dosis de HAT, por lo que se inclina a favor de HDAC. Esto no quiere decir que se produzca un aumento de los niveles de proteína de HDAC, sino que se produce un aumento de su actividad al no haber suficiente compensación por parte de HAT (134).

La alteración significativa de la homeostasis de la acetilación en procesos neurodegenerativos, refleja un mal funcionamiento de la acetilación. Por lo que se ha establecido una relación entre el descenso de los niveles de acetilación de histonas y tubulina con las enfermedades neurodegenerativas (134).

Diferentes estudios establecen que existe una fuerte relación entre el deterioro cognitivo y la acetilación de las histonas. Esta relación también se ha establecido con la función de las neuronas motoras (134). Por otro lado, y a pesar del escaso número de estudios realizados al respecto, se ha establecido una conexión entre la acetilación de tubulina y la función neuronal, habiéndose observado que la

hiperacetilación de tubulina se asocia con la protección frente a la degeneración axonal y que hay un descenso de la tubulina acetilada en modelos animales para enfermedades neurodegenerativas. Además, la tubulina acetilada se relaciona con la estabilidad de los filamentos de tubulina y los defectos en la acetilación de tubulina están asociados con un transporte anormal en las células neuronales, de la proyección de sus ramificaciones, defectos neuromusculares y daños en la función de los receptores de neuronas del tacto.

A partir de todos los datos anteriores se puede ver la importancia de los niveles de acetilación normales en histonas y tubulina para un correcto funcionamiento neuronal. Además, según estudios realizados en *Drosophila* con mutantes *dPANK/fbl* tras la adición de un inhibidor de HDAC se restauraron los niveles de acetilación y se rescató parcialmente la función locomotora de estos mutantes, con lo que se puede establecer una asociación entre los daños de acetilación y el fenotipo observado (134).

CoA y Autofagia

La autofagia es un proceso autodegradativo importante para el equilibrio energético en momentos críticos del desarrollo o como respuesta ante el estrés producido por la falta de nutrientes, por lo que su regulación es esencial para una correcta supervivencia celular (136).

Un estudio realizado en células de ratones y humanas confirma en cierta medida la relación con la autofagia al mostrar que la privación de nutrientes conduce a una disminución de los niveles de acetil-CoA, a una reducción de acetilación de proteínas citoplasmáticas y a la inducción de autofagia (136). Bajo estas circunstancias se han manipulado los niveles de acetil-CoA y, al mantenerlos altos, la autofagia se suprime. Esta supresión es dependiente de actividad transferasa de EP300 (E1A-binding protein p300), lo que sugiere que EP300 es regulada mediante los niveles de acetil-CoA (129).

Modelos animales en PKAN

Se han realizado grandes esfuerzos para poder diseñar modelos animales para realizar el estudio de este tipo de patologías, generando modelos *knock out* en moscas y ratones, aunque en ambos casos los fenotipos producidos son incompletos.

Drosophila melanogaster

Fumble (fbl) es el gen homólogo en *Drosophila* de PANK2, que codifica para varias isoformas de PANK entre las que se encuentra una larga nombrada como *fblL*, que se localiza en la mitocondria y dos cortas, *fblS1* y *fblS2*, que se localizan en el citosol. Las mutaciones en este gen producen moscas con lesiones cerebrales y defectos en las funciones neurológicas.

Este gen se define en FlyBase con el símbolo *Dmel/fbl*, como gen codificante en *Drosophila melanogaster* con 7 transcritos y 7 polipéptidos (6 de los cuales son únicos).

Se han descrito 21 alelos de PANK2 en este modelo animal, cuyas clases fenotípicas incluyen: defecto en el comportamiento locomotor y una mayor mortalidad.

Las líneas transgénicas de *D. melanogaster* realizadas con una baja expresión de *fbl* normal o PANK2 tienen un fenotipo similar a las moscas transgénicas mutantes del gen. Todas las mutantes tienen una actividad enzimática reducida y la gravedad del fenotipo se correlaciona con la actividad enzimática *in vitro*.

Estos mutantes tienen un fenotipo cerebral con un ciclo de vida más corto, pérdida progresiva de la función locomotora, infertilidad y neurodegeneración en el cerebro, observada por vacuolización en el mismo, y la retina. A nivel molecular se ha observado que hay reducción significativa de los niveles de CoA, reducción de los triglicéridos que sirven como almacenamiento de los ácidos grasos (lo que implica una homeostasis lipídica defectuosa), disfunción mitocondrial y aumento de la oxidación proteica. Por todo esto se considera que estos animales son buenos modelos de PKAN, a pesar de que la acumulación de hierro no haya podido demostrarse.

El fenotipo puede ser rescatado por la isoforma mitocondrial de *fb1*, aunque PANK2 y, hasta cierto punto, PANK3 y PANK4 han mostrado habilidades para rescatarlo, a excepción de la esterilidad masculina. También la administración de pantetina en la dieta rescata el fenotipo ya que se restauran los niveles de CoA, se recupera la función mitocondrial, mejora la capacidad locomotora, se rescata la degeneración cerebral, se aumenta el ciclo de vida y se han revertido los defectos en la acetilación de tubulina e histonas en otros estudios (116, 132, 138).

Mus musculus

La proteína PANK2 en humanos y ratones muestran una identidad del 90 %, aunque a diferencia del humano, el polipéptido de ratón no tiene la extensión N-terminal.

En 2005 se generaron ratones Pank2-null, (gen PankK2 nulo), que mostraban reducción de crecimiento, degeneración de la retina e infertilidad masculina debido a azoospermia, pero no producía trastornos en el movimiento, en el comportamiento o acumulación de hierro en el cerebro. Hay una falta de procesos neurodegenerativos en este modelo, lo que aún no ha podido ser explicado.

Se ha concluido que, aunque el modelo de ratón no recoge todas las características clínicas y neuropatológicas de la afección humana, podría servir como un modelo en el que estudiar los defectos de la función mitocondrial.

Además de la modificación genética de los animales, una dieta deficiente en ácido pantoténico era capaz de provocar un trastorno en el movimiento y azoospermia en ratones sin evidencia de acúmulo cerebral de hierro.

Algunos estudios plantean que la localización celular de la proteína Pank2 murina puede estar implicada en estos resultados. Al principio los estudios planteaban la localización de esta proteína tanto como mitocondrial como

citoplasmática, aunque recientemente ha sido confirmada como mitocondrial localizada en el espacio intermembrana, al igual que la proteína humana (138).

Esta localización mitocondrial de la enzima se ha visto reforzada por la observación de una estructura anormal con crestas remodeladas o dismórficas, inclusiones electrón-densas y una alteración del potencial de membrana mitocondrial. A pesar de estas anomalías, la falta de fenotipo neurológico puede explicarse debido a acciones compensatorias de las diferentes isoformas de PANK.

No obstante, los ratones “Pank2-null”, bajo una dieta cetogénica si mostraron los signos clínicos presentes en pacientes con PKAN, como desórdenes severos del movimiento y neurodegeneración, pero no mostraron acumulación cerebral de hierro. La administración de pantetina a estos ratones rescató el fenotipo, incluyendo los desórdenes de movimiento, y aumento del ciclo de vida. Igualmente se demostró los efectos positivos de la pantetina en modelos de, *Drosophila* (116, 132, 138).

REPROGRAMACIÓN DIRECTA

Debido a que la obtención de una biopsia cerebral es agresiva y no eficiente, el establecimiento de modelos de células neuronales utilizando técnicas de reprogramación, es necesario para dilucidar la fisiopatología celular de diferentes enfermedades neurodegenerativas como son las NACH.

Gracias a los experimentos pioneros de John Gurdon y Shinya Yamanaka (140) en el campo de la reprogramación genética se han abierto nuevos y prometedores caminos dentro de la medicina regenerativa con el objetivo de reponer las células perdidas como consecuencia de enfermedades. Existen dos grandes alternativas terapéuticas.

La primera se centra en la extracción de células del paciente que son reprogramadas a células madre pluripotentes (aquellas que pueden dar lugar a cualquier linaje celular del organismo). Posteriormente son expandidas *in vitro*,

diferenciadas al tipo celular afectado por la patología y trasplantadas de nuevo en el individuo. Este método conlleva, por un lado, la ventaja de poder generar cualquier tipo de célula necesaria, y por otro el hecho de que los trasplantes son autólogos y, por lo tanto, incapaces de generar rechazo por parte del sistema inmune (140).

La segunda vía terapéutica consiste en potenciar la regeneración desde dentro del propio tejido. Para ello, se induce la conversión de otros tipos celulares residentes en el propio órgano y no afectados por la patología, en las células objetivo que repondrán la población diezmada por la enfermedad. Este fenómeno se conoce como reprogramación directa *in vivo* o transdiferenciación (140).

Actualmente, la reprogramación *in vivo* se enfrenta al desafío de intentar cumplir requisitos imprescindibles para que la regeneración terapéutica se complete de una forma exitosa; el primero, es la correcta elección del tipo celular endógeno que va a ser reprogramado. Éste debe ser capaz de auto-regenerarse e idealmente debería compartir un origen embrionario lo más parecido posible a las células de destino, ya que esto los relaciona en cuanto a su perfil de actividad génica (segundo desafío de la reprogramación). En esencia podríamos comparar el genoma y la actividad de los genes con una gran mansión llena de miles de puertas. Durante el desarrollo embrionario, las células madre iniciales poseen la gran mayoría de estas puertas abiertas y accesibles. A lo largo del proceso de generación de los distintos órganos y tejidos, a medida que las poblaciones celulares se van especializando, muchas de estas puertas y corredores se van cerrando y abandonando, dejando únicamente activas aquellas que son necesarias para producir la maquinaria celular asociada a un tipo celular específico. Conocer la información relativa a la expresión génica de los diferentes tipos celulares confiere una gran capacidad de activar/abrir determinados genes/puertas concretos que permiten la transformación de esas células en aquellas que deseamos regenerar (140).

La reprogramación directa de una célula diferenciada en otro tipo de célula se logró por primera vez en 1987 con la conversión de fibroblastos en mioblastos

utilizando la expresión de un único factor de transcripción, (MYOD1) (141). Fue el primer estudio que proporcionó una conversión exitosa del destino celular entre linajes dentro de la misma capa germinal (mesodermo). En los años siguientes, varios estudios nuevos confirmaron que la conversión directa era posible al sobreexpresar los factores de transcripción, al menos entre linajes dentro del mesodermo, como el músculo liso (142,143), células sanguíneas (144, 145) o el músculo cardíaco (146). De hecho, utilizando diferentes cócteles de factores de transcripción (GATA4, MEF2C, TBX5 y HAND2), fue posible la conversión in vivo de fibroblastos cardíacos en cardiomiocitos funcionales (147, 148).

Numerosos estudios se han centrado en la conversión del destino celular debido a la importancia del desarrollo del sistema nervioso central (149).

Dentro de las investigaciones relacionadas con esta técnica, podemos nombrar investigaciones llevado a cabo con células gliales, donde los astrocitos prenatales como los postnatales se convirtieron en neuronas funcionales mediante la expresión única o combinada de tres factores de transcripción: PAX6, Achaete-scute complex-like 1 (ASCL1) y DLX2 (149-151). Debido a los exitosos experimentos descritos anteriormente y los avances en la generación de iPSCs, hace unos años varios grupos trataron de lograr la conversión directa de células somáticas en destinos celulares de diferentes capas germinales. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, debido a la naturaleza post-mitótica de las neuronas y la falta de modelos animales para su estudio, el enfoque de conversión directa se ha explotado principalmente para obtener progenitores neurales o subtipos neuronales específicos. El objetivo final es estudiar los mecanismos subyacentes a los trastornos neurodegenerativos y utilizar células similares a las neuronas como plataformas de detección o para terapias de reemplazo celular (Figura I19).

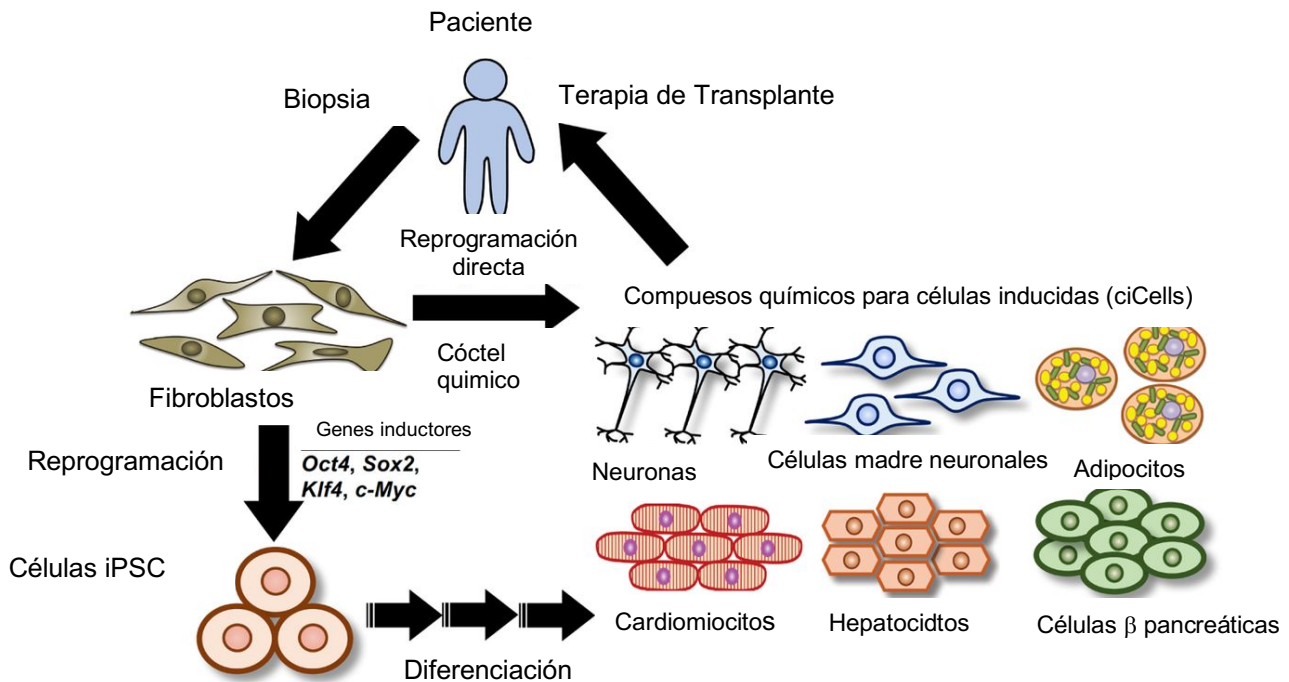


Figura I19: Resumen de las principales estrategias terapéuticas que emplean la reprogramación celular y sus aplicaciones. La figura muestra que partiendo de una biopsia de piel y su posterior cultivo celular en fibroblastos, puede seguir dos estrategias diferentes. La primera estrategia donde a través de la técnica iPSC usando genes inductores específicos, se pueden diferenciar a cualquier tipo celular, para su posterior estudio y más aproximación terapéutica, la segunda opción es la reprogramación directa, donde con compuestos químicos específicos para cada tipo de celular se pueden diferenciar directamente al tipo celular deseado sin tener que hacer antes iPSC, teniendo la gran ventaja tanto económica como de tiempo. (Adaptado193).

Reprogramación Neuronal directa

La primera conversión directa exitosa de fibroblastos murinos en neuronas inducidas (iNs) se logró en 2010, cuando Wernig y sus colegas identificaron una combinación de tres factores proneurales (el gen proneural ASCL1, los factores de transcripción Brain-2 [BRN2] y factor de transcripción de mielina 1 [MYT1L], fueron capaces de convertir fibroblastos embrionarios y postnatales murinos en neuronas funcionales *in vitro* (152). Se requirió la expresión de estos tres factores de transcripción para obtener neuronas electrofisiológicamente funcionales. Desde entonces, las iNs se definen como el producto de neuronas reprogramadas directamente a partir de células somáticas que evitan pasar a

través de la etapa pluripotente. Aproximadamente un año después, este enfoque se transfirió a fibroblastos humanos, utilizando el factor adicional de diferenciación neurogénica 1 (NEUROD1) para obtener iNs (153). Se observó que se necesitaban tiempos de conversión más largos para las células humanas en comparación con las células de ratón. Desde entonces, la estrategia de expresión exclusiva de diferentes factores de transcripción se ha utilizado con éxito para generar iNs (154-156). Sin embargo, desde el principio, la generación de iNs utilizando la reprogramación directa ha tenido un desafío principal: alcanzar una alta eficiencia de conversión, que se define como el porcentaje de iNs obtenido en relación con el número de células de partida sembradas en una placa. Aunque puede ser muy variable dependiendo de las células iniciales y del protocolo utilizado, los primeros enfoques que utilizan la reprogramación directa obtuvieron muy bajas eficiencias de conversión entre 5-10% (157, 158). Además, también es necesario alcanzar un buen porcentaje de pureza, que se define como el número de iNs en la población final relacionada con el total de células sembradas inicialmente en la placa. Estos dos parámetros son cruciales ya que las neuronas son células post-mitóticas que no pueden expandirse mucho más.

Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión de diferentes combinaciones de microARN (miRNA) específicos neuronales, dirige la conversión de células somáticas en iNs (159, 160), aunque la mayoría de las veces las iNs generadas eran inmaduras y las eficiencias de conversión eran bajas. Además de usar miRNAs, se ha demostrado que la activación de genes neuronales puede ser un enfoque diferente para la conversión directa neural. Por ejemplo, la represión de la proteína de unión al tracto de polipirimidina (PTB) de unión a ARN, permitió la activación de miARN en varios componentes del complejo REST (factor de transcripción silenciador RE1) y la posterior expresión de genes neuronales específicos (161). REST se considera un factor de transcripción relevante para la reprogramación, ya que se expresa en células no neuronales donde reprime los genes neuronales (162). Hace unos años, se demostró que las combinaciones de moléculas pequeñas que inhiben la señalización de la glucógeno sintasa quinasa-3 β y proteínas SMAD que son factores de transcripción que regulan, la expresión de genes neurogénicos, podrían mejorar la eficiencia de conversión (163). De hecho, recientemente se demostró que es

posible someterse a una reprogramación directa en iNs solo manipulando químicamente las vías involucradas en la diferenciación neural (164). Actualmente, la combinación de las diferentes estrategias parece ser el mejor enfoque para lograr altas eficiencias de conversión durante la generación de iNs. Por ejemplo, una combinación de sobreexpresión de genes proneurales (ASCL1, MYT1L y NEUROD1) con miRNAs como miR9 / 9 * o miR124, resultó en la generación de neuronas funcionales con propiedades fisiológicas maduras a partir de fibroblastos humanos (158). Las combinaciones de moléculas pequeñas junto con la sobreexpresión de factores proneurales han convertido con éxito las células somáticas adultas en iNs (165, 166).

Los obstáculos que nos podemos encontrar en esa técnica son el origen y el estado de las células de partida. Las iNs humanas tardan más en madurar y en generar potenciales de acción en comparación con las iNs de ratón (156,161, 167). Además, las células de donantes jóvenes o embrionarios se convierten con mayor eficiencia que las células de donantes envejecidas, lo que es un desafío para el modelado de enfermedades de aparición tardía (155, 165). Estudios recientes han demostrado que las combinaciones de moléculas pequeñas, factores de crecimiento, la sobreexpresión de factores de transcripción proneurales (ASCL1 y BRN2) y el silenciamiento del complejo REST, pueden mejorar la eficiencia de conversión hasta más del 50% utilizando células de donantes envejecidas como material de partida (162, 168, 169). Este enfoque basado en un solo paso y en un solo vector desarrollado por Drouin-Ouellet et al. puede generar rendimientos muy altos de iNs de pacientes con trastornos neurodegenerativos, independientemente del número de pasos de los fibroblastos de la piel (168, 170, 171). Este método simple ha facilitado la aplicación de la reprogramación neuronal directa para estudios de modelado de enfermedades. En el caso de algunas enfermedades, es importante estudiar los mecanismos fisiopatológicos en los subtipos de neuronas afectadas (170), ya que los diferentes subtipos de neuronas pueden expresar fenotipos distintos relacionados con la enfermedad (172). De hecho, la forma correcta de estudiar los fenotipos asociados a la enfermedad sería comparar los subtipos específicos de iN afectados en la enfermedad con los subtipos de iN no afectados. Hasta la fecha, el método predominante por el cual se identifica la población de iNs se

basa en la expresión de marcadores neuronales como β III-Tubulina (TUJ1), proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP-2) y / o proteína Tau, y la observación de morfología neuronal (área del núcleo disminuida, alargamiento, aumento del número de ramas) (174-176).

Ventajas y desventajas

La reprogramación directa tiene varias ventajas en comparación con la generación de células derivadas de iPSC, como la relativa simplicidad y los requisitos de tiempo corto; por lo tanto, el costo se reduce (157). Adicionalmente las iNs, a diferencia de los iPSC, mantienen el envejecimiento y las marcas epigenéticas del donante (173, 174, 176), lo que los convierte en excelentes candidatos para modelar la fisiopatología neuronal en los trastornos relacionados con la edad. Además, a diferencia de las iPSC que son susceptibles de formar tumores después del trasplante (178), se ha demostrado que las iNs obtenidas mediante la reprogramación *in vivo* no causan procesos tumorigénicos. Por lo tanto, en el futuro podrían ser una herramienta prometedora para la terapia celular. Por esa razón, la generación de iNs u otros tipos de células mediante la reprogramación directa de fibroblastos derivados del paciente que padecen enfermedades neurodegenerativas es un gran avance para comprender la patogénesis de estos trastornos y para descubrir nuevos enfoques terapéuticos.

Además, los vectores retrovirales o lentivirales comúnmente utilizados para introducir factores de transcripción son potencialmente peligrosos por causar mutaciones genéticas no deseadas. Específicamente, los iNs tienen sus propios desafíos como modelo *in vitro* para estudiar la fisiopatología de las enfermedades. Primero, la expansión *in vitro* para conseguir una conversión exitosa (178,179). Además, mantener las iNs en cultivo es difícil y lograr una gran cantidad de iNs durante los cultivos a largo plazo es muy desafiante, restrictivo y costoso, ya que la muerte celular se puede observar a partir de los 30 días posteriores a la infección (DPI). Este hecho puede dificultar la caracterización electrofisiológica de las iNs, ya que cuando se pueden empezar a detectar potenciales de acción es a partir del día 46 post- infección y

generalmente se observan a 80- 100 días post-infección (180). Además, las iNs tienden a formar grupos durante el proceso de reprogramación, lo que dificulta el aislamiento de células individuales para su posterior análisis (Tabla I4).

Tabla I4: Resumen de la ventajas de la reprogramación directa Vs iPSC.

Parámetros	Diferenciación Via iPSC	Reprogramación directa
Tiempo	Durante varios meses	Proceso rápido, en varias semanas
Dificultad	Procedimiento complicado	Proceso Cómodo y reproducible
Tipo celular necesario	Células alogénicas para trasplante	Células autólogas para trasplante
Riesgo	Riesgo de sufrir tumorigénesis debido a la inducción de genes	Bajo riesgo de sufrir tumorigénesis
Aplicación	Riesgo de sufrir tumorigénesis debido a la presencia de células no diferenciadas	Posible aplicación para medicina personalizada

Aplicaciones de la reprogramación directa

La transdiferenciación es muy prometedora para aplicaciones biomédicas como la medicina regenerativa y el modelado de enfermedades basado en células. Las células somáticas (por ejemplo, fibroblastos de la piel) se pueden convertir directamente en otros tipos de células específicas. Las células convertidas se pueden usar en el modelado de la enfermedad (para analizar un fenotipo específico de la enfermedad) (164, 181-186), detección farmacológica (para identificar fármacos que interfieren con el fenotipo de la enfermedad), pruebas de toxicidad del fármaco (para identificar los efectos secundarios de posibles fármacos en diferentes tipos de células somáticas) y la terapia de reemplazo

celular (187), ya que es posible dirigir las células de conversión in vivo, evitando la necesidad de inmunosupresión. Actualmente, el enfoque de terapia celular mejor estudiado y más cercano a la aplicación clínica, es el trasplante de células progenitoras fetales del subtipo neuronal afectado en la enfermedad (188, 189).

Sin embargo, en los últimos años, varias investigaciones se han centrado en la reprogramación neural in vivo a partir de astrocitos o progenitores de oligodendrocitos / NG2 glia (190). Es importante darse cuenta de que la reprogramación in vivo no solo tiene lugar en un entorno dañado y no controlado, sino también en una mezcla compleja de muchos tipos de células diferentes. El primer intento fue convertir las células gliales reactivas en neuronas después de una lesión cerebral hace unos años. Desde entonces, se han realizado grandes avances con respecto a la eficiencia de conversión y madurez de iNs (192).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis consiste en la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos de las NACH, en concreto en la Neurodegeneración asociada a la Pantotenato Quinasa (PKAN) en los fibroblastos y células neuronales derivadas de los pacientes y la evaluación en dichas células de la eficacia de una colección de fármacos comerciales, incluyendo los medicamentos más comunes que se utilizan en el tratamiento de los pacientes en la práctica clínica.

El tratamiento personalizado *in vitro* de los fibroblastos y células neuronales (que son el tipo celular más afectado) derivadas de los pacientes NACH con una amplia gama de opciones farmacológicas disponibles actualmente y el seguimiento de su efecto sobre los cambios fisiopatológicos ayudarán a una mejor y más objetiva elección terapéutica para los pacientes. El modelo propuesto también será útil para evaluar la eficacia de nuevas opciones terapéuticas desarrolladas en el futuro.

Una gran parte de las mutaciones asociadas a enfermedades humanas causa la desestabilización de proteínas específicas. Sin embargo, la actividad de las proteínas inestables puede ser rescatada por moléculas pequeñas que pueden actuar como sustrato de la enzima. No todos los genotipos de una enfermedad dada son susceptibles para la terapia de moléculas que pueden actuar como sustrato. En esta tesis trataremos de identificar tratamientos que actúan como sustratos capaces de restaurar la actividad de la enzima PANK2 mutante. Siguiendo este enfoque, muchos medicamentos comerciales se han reposicionado con éxito para las enfermedades raras.

OBJETIVOS CONCRETOS A DESARROLLAR EN LA TESIS

- 1) Caracterización de la fisiopatología de los fibroblastos derivados de pacientes PKAN con mutaciones en el gen de la Pantotenato quinasa 2 (PANK2). Selección de las alteraciones fisiopatológicas para la adecuada evaluación de la efectividad de los compuestos en el cribado farmacológico.**
- 2) Cribado farmacológico utilizando fibroblastos procedentes de los pacientes PKAN. Confirmación y mecanismos implicados en el efecto de los compuestos positivos. Estudio en profundidad del metabolismo del hierro, del metabolismo lipídico y de las alteraciones ultraestructurales, metabólicas y bioenergéticas.**
- 3) Caracterización de las neuronas inducidas generadas por reprogramación directa a partir de los fibroblastos derivados de los pacientes PKAN. Evaluación de compuestos positivos en las células neuronales diferenciadas. Estudio de la acumulación de hierro en las neuronas control y mutantes.**

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

M.1. Reactivos

- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): Anticuerpo monoclonal anti- actina, Negro Sudán, Azul de Prusia, pantotenato sódico, luperox® DI (tert-Butyl perox-ide), deferiprona, cloruro de hierro II, salicilaldehido isonicotinoil hidrazona y tripsina.
- Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR): Mitosox™, MitoTracker RedCMXRos, DAPI y Hoechst 3342
- PharMingen (BD Bioscience, San Jose, CA): Anticuerpo anti-citocromo c y anti-MAP2
- Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,CA): Anticuerpo anti-receptor transferrina 1 (TfR1), anti-cadena ligera ferritina, anti-transportador de metal divalente 1 (DMT1), anti-desulfurasa cisteína (NFS1), anti- PANK1, anti- PANK2, rotenona 1g,
- Thermo-Fisher (Waltham, MA): Anticuerpo anti-proteína reguladora del hierro 1 (IRP-1), anti-Tau clon HT7 y anti- PANK3.
- Merck Milipore (Darmstadt,Germany): Kit de detección de proteínas oxidadas (Oxyblot)
- DojindoMolecular Technologies, Inc. (Rockville, MD): MitoPeDPP
- Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA): Acrilamida solución 37.5:1, Clarity™ Western ECL sustrato, bufer de electroforesis (TGS), SDS, Triton X-100, bufer de transferencia (TG), Tween-20.
- Panreac (Barcelona, Spain): Acetato potásico, 2-isopropanol, etanol, n-hexano, metanol, cloruro sódico, base-Tris, persulfato de amonio (APS), acido acético glacial, KOH, KCL.
- Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland): Cóctel de inhibidor de proteasas.
- Seahorse Bioscience Inc. (Billerica, MA, USA): Kit Mito-stress incluyendo, oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A, placas de cultivos celulares XFe24, cartuchos sensores y medio base XF.

- Takara Bio Inc. (Nojihigashi, Kusatsu, Japan): Medio Ndiff 227

M.2. Declaración ética

La aprobación del comité ético del Hospital Universitario Virgen Macarena y Virgen del Rocio de Sevilla (España), fue obtenido acorde a los principios de la declaración de Helsinki todas las conferencias Internacionales en armonización y guía de Buenas Practicas Clinicas.

M.3. Cultivos celulares

Se trabajó con fibroblastos dérmicos derivados tres sujetos sanos (control 1, control 2 y control 3, dos adultos y uno neonatal) adquiridos en la ATCC (American Type Culture Collection) y tres pacientes afectados por PKAN, adquiridos de la Unidad de Desorden del movimiento del Hospital Universitario Virgen del Rocio de Sevilla, España y desde el Biobanco de la Unidad de Desorden del movimiento del Instituto de Neurología Carlo Besta (INCB), Milan, Italia.

Uno de los pacientes (P1) es un doble portador heterocigoto en la posición 747dup (p.Arg249ProfsX43) que causa un codón de stop y c.1475C>G (p.Ala492Gly) que causa un cambio de sentido, predicho por las herramientas informáticas como PolyPhen2 (194). El segundo paciente (P2) es un doble heterocigoto con un cambio de sentido en la posición 240-241 delCA y T2171 (650C>T), mutaciones previamente descritas (195). El tercer paciente (P3) es portador de una mutación homocigotica 1259delG, causando un cambio de lectura p.F419fsX472. (196). Los fibroblastos crecieron en medio DMEM (Sigma) suplementado con el 20% FBS (Sigma), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml penicilina y 4 mM L-Glutamina (Sigma) a 37°C y 5% de CO₂. Todos los experimentos fueron realizados con cultivos de células de fibroblastos con un número de pase menor a 10.

M.4. Morfología celular

La morfología celular fue evaluada por microscopía óptica. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, EE. UU.). Los valores se representan como el valor medio obtenido y su desviación estándar \pm DE para las células control y las células patológicas.

M.5. Tratamientos

Durante la realización de esta tesis se ha trabajado con células procedentes de sujetos sanos y células afectadas por la mutación PANK2 que han sido tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M durante 15 días, sembradas en medio DMEM (Sigma) suplementado con el 10% FBS (Sigma), 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml penicilina y 4 mM L-Glutamina (Sigma) a 37°C y 5% de CO₂.

M.6. Determinación de la acumulación de hierro por la tinción Azul de Prusia.

Para observar el hierro intracelular se empleó la tinción de Azul de Prusia, descrita anteriormente por otros autores (197). Este compuesto de color azulado se une al Fe³⁺ dentro de la célula. Para su realización se sembró 3x10⁴ cel/ml en medio DMEM 1% de glucosa, con 10% de FBS y 1% de antibiótico durante 3 días en placas de 6 multipocillos. Tras ello se retiró el medio de cultivo y se lavaron x3 con PBS1x. Una vez lavadas se les añadió el fijador (10ml de fijador: 0,380g de paraformaldehído, 20 μ l de NaOH 5%, 0,625 ml de PBS 20x y 10 ml de agua destilada) y se incubaron 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el fijador y se volvieron a lavar x3 con PBS1x. Una vez realizados los pasos anteriores, las células se incubaron 30 minutos en agitación con la solución Azul de Prusia a temperatura ambiente; pasado el tiempo se retiró la solución y se lavaron con PBS1x hasta que se eliminó la tinción del medio y solo fue apreciable en el interior celular. Por último la tinción de Azul de Prusia fue cuantificada en un lector de placa (Polar star Omega, BMG Labtech) y microscopía óptica en campo claro. Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas con el software de imagen ImageJ. Los valores obtenidos se

representan como el valor medio obtenido y su desviación estándar \pm DE para las células control y las células patológicas.

M.7. Determinación de hierro por el ensayo de la Ferrozina

La concentración de hierro intracelular se determinó mediante el ensayo de la Ferrozina descrito previamente (198). En un medio ácido, el hierro se libera del complejo de la transferrina, a continuación el ascorbato reduce los iones de Fe^{3+} liberados a iones Fe^{2+} , que reacciona con la ferrozina para formar un complejo cromático. La intensidad cromática del colorante se determina midiendo su absorbancia, siendo proporcional a la concentración de hierro.

La calibración se realizó para seis estándares y los coeficientes de correlación (r) variaron de 0,98 a 0,99. Las concentraciones se muestran en $\text{nmol Fe}^{2+} / \mu\text{g}$ de proteína. Los valores obtenidos se representan como el valor medio obtenido y su desviación estándar \pm DE para tres experimentos independientes.

M.8. Determinación de hierro por Espectrofotometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

Para confirmar los datos obtenidos a través de la tinción de Azul de Prusia y de la Ferrozina, se determinó los niveles de hierro intracelular usando la técnica ICP-MS descrita anteriormente (199).

La espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICPMS), es altamente sensible y capaz de determinar de forma cuantitativa casi todos los elementos que tengan un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón a concentraciones muy bajas (nanogramo/litro o parte por trillón, ppt). Se basa en el acoplamiento de un método para generar iones (plasma acoplado inductivamente) y un método para separar y detectar iones (espectrómetro de masas).

La calibración se realizó para seis estándares y los coeficientes de correlación (r) variaron de 0,98 a 0,99. Las concentraciones se muestran en $\text{nmol Fe}^{2+} / \mu\text{g}$

de proteína. Los valores muestran la media de la desviación estándar \pm DE para tres experimentos independientes.

M.9. Determinación de la acumulación de lipofuscina por la tinción Negro Sudán.

Es una tinción utilizada para la detección de agregados de lípidos en el interior celular que pondrá de manifiesto la lipofuscina, un pigmento formado en los lisosomas de las células que sufren auto-oxidación progresiva y prolongada de lípidos insaturados.

Para llevar a cabo esta tinción las células se sembraron en medio DMEM al 1% de glucosa, 10% de FBS y 1% de antibiótico durante 3 días en placas de 6 multipocillos. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron x3 con PBS1x. Una vez lavadas se les añadió el fijador (10ml de fijador: 0,380g de paraformaldehído, 20 μ l de NaOH 5%, 0,625 ml de PBS 20x y 10 ml de agua destilada) y se incubaron 5 minutos en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se retiró el fijador y se volvieron a lavar x3 con PBS1x. Una vez realizados los pasos anteriores, las células se incubaron 20 minutos en agitación con la solución Negro Sudán a temperatura ambiente; pasado el tiempo se retiró la solución y se lavaron con etanol al 70% hasta que se eliminó la tinción del medio y solo fue apreciable en el interior celular.

La cuantificación de la tinción de Negro Sudán se realizó en un lector de microplacas y mediante microscopía óptica. La detección de autofluorescencia se realizó mediante microscopía de fluorescencia (excitación 366 nm; emisión 420–600 nm). Los espectros de emisión de los gránulos de lipofuscina se obtuvieron mediante microscopía de barrido láser confocal (Nikon A1R, Shinagawa, Tokio, Japón). Fuente laser de excitación 405 nm. Los espectros se detectaron en pasos de 5 nm. Los espectros de emisión se registraron en 10 gránulos de lipofuscina en 20 células.

M.10. Purificación de los granulos de lipofuscina y Microscopia Electrónica con Espectrofotometría de Rayos (SEM/EDX)

La lipofuscina se aisló utilizando un método descrito por Boulton y Marshal (200). Todo el proceso experimental se llevó a cabo en hielo con tampones enfriados previamente, y todas las centrifugaciones se realizaron a 4 ° C. A continuación, los sedimentos celulares se homogenizaron en presencia de un tampón de lisis (HEPES 50 mM, sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM, acetato de potasio 0,1 M, pH 7,5) complementado con inhibidores de proteasas (Cóctel inhibidor de proteasa / Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) en un homogeneizador Dounce y se rompieron por sonicación durante 30 segundos a 4 ° C utilizando el equipo Branson Ultrasonics Sonifier S-450.

Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 60 × g durante 7 min. El sobrenadante resultante se eliminó y se centrifugó (6000 x g; 10 min). El sedimento se resuspendió en tampón de bloqueo, y la suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo que consistía en cinco concentraciones diferentes de sacarosa en el tampón de bloqueo: 1.6, 1.5, 1.4, 1.2, 1.0 y 0.25 M. La separación del gradiente se logró por centrifugación a 100,000 × g durante 1 h en un rotor basculante (TSL-55, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE. UU.). La interfaz que contiene lipofuscina del primer gradiente de sacarosa se identificó por su espectro característico de excitación / emisión de fluorescencia en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). La lipofuscina aislada se extendió sobre una cinta de carbón conductora y se secó antes del vacío. Posteriormente, se analizaron los gránulos de lipofuscina usando el SEM / EDX. El análisis se realizó a 20 kV con un Hitachi S-4800 SEM-FEG (Minato-ku, Tokio, Japón) equipado con un detector Bruker X-FLASH 4010 (Billerica, MA, EE. UU.) con una resolución de 133 eV en la línea Mn K α . El análisis de los espectros EDX se llevó a cabo mediante el software Origin 2018 (Originlab Corp. Northampton, MD, EE. UU.) utilizando el método de Cliff-Lorimer sin estándares, como se describe en otros artículos (201). Los resultados se expresan como fracciones molares en porcentaje atómico (en%) y en fracciones en peso (% en peso).

M.11. Ensayo de Inmunotinción/ Western Blot

El ensayo de Western Blot se realizó usando métodos estándares. Las muestras fueron lisadas utilizando el tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, pH 8,0), y la concentración de proteínas fue determinada por el método Lowry (202).

Las muestras se separaron en un gel SDS-PAGE de acrilamida/bisacrilamida al 12% (TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, Bio-Rad, EE. UU.) a un voltaje de 20 V en tampón TGS 1X (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0,1%, pH 8,3).

Una vez finalizada la electroforesis se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) en un sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, EE. UU.) a 25 V durante 10 minutos utilizando el tampón de transferencia Trans-Blot Turbo (TG). Una vez finalizada la transferencia para verificar que fue correcta, se realizó la tinción rojo Ponceau, donde pudimos ver las proteínas teñidas con este colorante y confirmar su carga.

Una vez confirmada la carga de proteínas, se realizó el bloqueo con BSA al 5% en T-TBS al 0,05% (tampón de bloqueo) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se incubaron con anticuerpo primario a la dilución apropiada (1:500-1:1000) en tampón de bloqueo con agitación suave a 4 ° C durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con 0,05% de T-TBS para eliminar el anticuerpo no unido. Posteriormente, se usaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (horseradish peroxidase) apropiados para la especie (1:2500) en el tampón de bloqueo para detectar la proteína de interés con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizaron tres lavados con T-TBS al 0.05% y las proteínas de interés se identificaron utilizando el sustrato ECL Clarity Western (Bio-Rad, EE.

UU.). Se utilizó el sistema de imágenes ChemiDoc™ XRS + para visualizar señales en las membranas.

M.12. Microscopía de inmunotinción

Los fibroblastos se sembraron en cubreobjetos de vidrio estéril de 1mm de ancho durante 24-48 horas en medio DMEM al 10% de FBS (ThermoScientific™ Gold Seal™, Waltham, MA, USA). Las neuronas inducidas fueron sembradas en placas de 4/8 multipocillos (Ibidi Inc., Martinsried, Germany).

Posteriormente las células se lavaron con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1% durante 10 min.

Para la inmunotinción, los cubreobjetos de vidrio con las células sembradas se incubaron con anticuerpos primarios diluidos 1:100-1:500 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con PBS, y se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos 1:200 en solución de bloqueo al cubreobjetos con las células. Las muestras fueron incubadas durante dos horas a 37°C. Se lavaron con PBS se incubaron con DAPI (1 µg/mL), y se lavaron con PBS dos veces.

Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de microscopio con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) y se analizaron con un microscopio de fluorescencia vertical (Leica DMRE, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Los estudios de colocalización se realizaron utilizando un sistema DeltaVision (Applied Precision; Issaquah, WA) con un microscopio Olympus IX-71 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japón).

M.13. Microscopía electrónica

La microscopia electrónica se realizó siguiendo el protocolo descrito (203).

Los fibroblastos se fijaron durante 15 minutos en placas de cultivo con glutaraldehído al 2% en medio de cultivo y durante 30 minutos en glutaraldehído al 2% con tampón cacodilato de sodio a 0.1 M, pH 7,4.

Posteriormente, se lavaron tres veces en cacodilato de sodio 0,2 M, pH 7,4 durante 10 min y se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% y 0.15 M cacodilato sódico 0,15 M pH 7.4 durante 30 min. Después de la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol, 5 min para cada paso: 30, 50, 70 y 95%, la inclusión se hizo en Durcupan® Fluka y polimerizado a 60°C durante 48 h. Las secciones de 1 µm se tiñeron con azul de toulidina y las secciones de 60–80 nm se cortaron con un ultramicrotomo Leica UM6. Las secciones ultrafinas se observaron sin acetato de uranilo y con tinción de citrato de plomo, para evitar imágenes de artefactos y precipitados. Se analizó usando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Libra 120.

M.14. Muerte celular en células PKAN con rotenona y cloruro de hierro

Las células fueron sembradas en placas de 6 multipocillos a una confluencia de 3×10^4 cel/ml por pocillo. Se dejaron crecer a 37°C y al 5% de CO₂ durante 3 días. Posteriormente, se añadió rotenona a la concentración de 10 µM y cloruro de hierro II a 500 µM, realizándose mediciones cada 6-12 horas.

Las células viables se contaron a partir de su morfología celular normal y nuclear, y la exclusión del yoduro de propidio en un microscopio de contraste de fase y de fluorescencia a una ampliación de $\times 100$. En cada caso, se contaron 10 campos aleatorios y más de 500 células. La muerte celular se determinó midiendo la liberación de LDH en el medio utilizando el kit de ensayo de integridad de membrana homogénea CytoTox-ONETM (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

M.15. Análisis del metabolismo del hierro (LIP-Calceína)

Para examinar el efecto beneficioso de los compuestos en fibroblastos mutantes PKAN, se estudiará la homeostasis del hierro. La determinación del “pool” de hierro lábil (LIP) fue realizado como se describió anteriormente (196).

Las células fueron sembradas en placas de 12 multipocillos se dejaron crecer durante 3 días en medio DMEM al 1% de glucosa, 10% de FBS y 1% de antibiótico.

Posteriormente las células se lavaron con PBS 1X y se le añadió medio de carga (medio sin glucosa ni bicarbonato con 20mM HEPES, 1mg/ml BSA y 0,25 μ M calceína) durante 15 minutos a 37°C. Transcurrida la incubación se retiró el medio y se lavó x3 con PBS1x, tras lo cual se añadió el medio de medida (medio sin glucosa ni bicarbonato con 5mM glucosa, 20nM HEPES y 150mM NaCl) y se dejó reposar 5 minutos antes de proceder a la primera medición (F1), la fluorescencia basal usando el POLARstar Omega Microplate Reader a 485 (excitación) y 535 nm (emisión). Tras esta primera medición las células fueron suplementadas con el quelante SIH (Salicyladehyde Isonicotinoyl Hydrazone) a 100 μ M durante 15 minutos. Transcurrido dicho tiempo se realizó una segunda medición (F2).

El cociente F1/F2 dará el contenido de hierro libre celular. Finalmente, los resultados se normalizaron al contenido proteico.

M.16. Estudio de la peroxidación mitocondrial: MitoPeDPP

Para observar el estado de peroxidación mitocondrial de las células se usó el MitoPeDPP. Este compuesto es capaz de penetrar a través de las membranas celulares acumulándose en las membranas mitocondriales internas donde puede ser oxidado por los lípidos peroxidados emitiendo fluorescencia.

Para realizar esta técnica las células fueron tratadas 3 días antes en placas in vivo (Ibidi), previamente tratadas con poli-lisina. Tras ello se eliminó el medio de cultivo y se lavó x2 con PBS1x. Una vez se lavaron las células, se les añadió el

MitoPeDPP a $0,3\mu\text{M}$ y se incubaron 20 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente se eliminó el medio y se lavaron x2 con PBS1x, tras lo que se les añadió medio de cultivo.

Para comprobar que el compuesto había actuado correctamente se utilizó un pocillo de células como control positivo; una vez que las células ya habían sido tratadas y estaban en el medio de cultivo se les añadió tert-Butil hidropéroxido (*t*-BHP) al $0,5\text{mM}$. Este compuesto produce la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial. Tras 15 minutos de incubación a 37°C se lavó el pocillo x2 con PBS1x y se volvió a añadir el medio de cultivo.

Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia con el sistema Delta Vision con el objetivo 40x. Se midió la fluorescencia (excitación: 452nm ; emisión: 470nm) sacando fotos cada 10 min realizándose mediciones pasadas las tres horas desde la adición de los compuestos, ya que se empieza a apreciar la fluorescencia pasado ese tiempo.

M.17. Determinación del grupo Hemo

El contenido del grupo hemo se determinó en los fibroblastos de pacientes y controles como se ha descrito anteriormente (204).

La medición consiste en que cuando las células se incuban en una solución con ácido fórmico estas expulsan al medio el grupo hemo, el cual es capaz de medirse con ayuda del espectrofotómetro a 400nm usando la ley de Lambert Beer donde $\epsilon=1,56 \times 10^5$.

Se sembraron 30.000 células de cada tipo celular para llevar a cabo esta medición. Las células se lavaron con PBS 1X para eliminar los restos de medio. Posteriormente estas células se disolvieron en $500\mu\text{l}$ de ácido fórmico al 98% y se incubaron durante 15 minutos. Tras ello las muestras se centrifugaron a 4°C y 1000 rcf tomándose el sobrenadante para medir la absorbancia a 400nm con un coeficiente de extinción de $1.56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Los datos fueron normalizados al contenido proteico usando el ensayo de Biorad Protein.

M.18. Evaluación de las proteínas carboniladas por Western Blot

Las proteínas son uno de los principales objetivos de los radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas. La modificación oxidativa de las proteínas, modifica las cadenas laterales de metionina, histidina y tirosina, y forma enlaces disulfuro de cisteína. La oxidación de proteínas catalizada por metales introduce grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) en los residuos de lisina, arginina, prolina o treonina de una manera específica.

La modificación oxidativa de las proteínas puede modular su actividad enzimática, las actividades de unión al ADN de los factores de transcripción y la susceptibilidad a la degradación proteolítica. Este hecho sugiere la importancia de la modificación oxidativa de proteínas individuales en la fisiopatología de enfermedades que sufren procesos mediados por radicales libres.

La detección de proteínas oxidadas, se realizó utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas OxyBlot™ (Millipore, EE. UU.), que proporciona una metodología sensible para la detección y cuantificación de proteínas modificadas por radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas mediante la detección de grupos carbonilo (sello distintivo del estado de oxidación de las proteínas).

Los grupos carbonilo de proteínas se midieron siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Las proteínas (5 µg) se incubaron con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar los derivados de 2,4-dinitrofenil (DNP) hidracina por derivatización de grupos carbonilo. Las muestras de proteínas derivadas de DNP se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas que contienen DNP se inmunotizaron usando anti-DNP (1: 150) y IgG conjugada con HRP (1: 300). Las proteínas carboniladas se identificaron utilizando el sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad, EE. UU.). El sistema de imágenes ChemiDoc™ XRS + se utilizó para visualizar las señales en membranas.

M.19. Fraccionamiento celular y aislamiento de proteínas mitocondriales

El fraccionamiento subcelular se realizó siguiendo el protocolo de Abcam (http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/subcellular_fractionation.pdf) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el Dr. Richard Patten. Las células se lisaron con un tampón de fraccionamiento subcelular (sacarosa 250 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas, pH 7,4). La suspensión celular se pasó a través de una aguja de calibre 25 durante 10 veces en una jeringa de 1 ml. A continuación, se centrifugó a 1500 g durante 20 minutos donde se eliminaron los núcleos y las células que no se lisaron.

El sobrenadante que contenía mitocondrias se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó a 12000 g durante 10 min. El sobrenadante ("fracción citosólica") se transfirió a otro tubo nuevo y el sedimento enriquecido en mitocondrias ("fracción mitocondrial") se disolvió en un tampón RIPA que contenía una mezcla de proteasas e inhibidores de fosfatasa (Roche). Las fracciones citosólicas se concentraron utilizando dispositivos Centricon YM-10 (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

M.20. Determinación de los niveles de CoA por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Los niveles de CoA en la fracción mitocondrial se analizaron por HPLC como se describió anteriormente (205). Las concentraciones de CoA estándar se determinaron utilizando una absorbancia molar de 16,000 a 260 nm. Estos agentes se disolvieron en un tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ de 50 mmol / l (pH 7,0). Las fracciones mitocondriales fueron resuspendidas en $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ y se sonicaron (10% de amplitud durante 10 s). Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA) y el filtrado (10 μl) se inyectó directamente en el sistema de HPLC. El contenido de CoA se midió de la siguiente manera: En el método empleado se utilizó una columna C18 Shim-pack VP-ODS (150 mm L x 4.6 mm ID, 5 μm) eluido con 100

mmol / L de NaH_2PO_4 y 75 mmol / L de CH_3COONa (el pH se ajustó a 4.6 por adición de concentrado), H_3PO_4 -acetonitrilo (94: 6, v / v) a un caudal de 1,0 ml / min. El detector ultravioleta (UV) se ajustó a 259 nm.

Los estándares de CoA se eluyeron en aproximadamente 3,5 minutos en estas condiciones. Las proteínas mitocondriales se determinaron utilizando el ensayo de Lowry (202). Los valores de CoA fueron referidos al contenido de proteína en la fracción mitocondrial.

M.21. Análisis de la red mitocondrial

Los fibroblastos y las neuronas inducidas desde fibroblastos fueron incubadas con 100 nM MitoTrackerTM Red CMXRos durante 45 min a 37°C. Después se lavaron con fosfato bufer salino 1X y fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 durante 10 min. En el caso de las neuronas fueron bloqueadas con suero de burro al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente y después incubadas con anticuerpo de ratón anti-Tau (1:500) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente las neuronas inducidas fueron incubadas con anticuerpo Cy2 anti-raton (1:200) durante dos horas y con DAPI (1 µg/mL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron usando el sistema DeltaVision (Applied Precision; Issaquah, WA, USA) con un microscopio Olympus IX-71.

La fluorescencia de MitoTrackerTM Red se midió para comparar la morfología mitocondrial utilizando el software ImageJ. En el caso de las neuronas, solo se midió la fluorescencia de MitoTrackerTM Red de las células Tau +.

La cantidad de fragmentación mitoncondrial fue evaluada usando el software IFDOMETER (207).

Para cada experimento y condición se analizaron un total de 100 imágenes de tres replicas biológicas diferentes, y fueron usadas para calcular el número de mitocondrias redondas pequeñas por célula. Se tomó en cuenta la longitud o la relación entre el eje mayor y menor de la mitocondria y el grado de circularidad.

M.22. Bioenergética y análisis del estrés oxidativo mediante el analizador Seahorse

La función respiratoria mitocondrial de las células control, células PKAN y células PKAN tratadas con pantotenato sódico a 500 μM , se determinó mediante el ensayo de Mito- estrés con el analizador de flujo extracelular XFe24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, EE. UU.) El número de células a sembrar fue de 30.000 células por pocillo y la concentración de los compuestos de inyección fueron 1 μM de oligomicina, 2 μM de FCCP, rotenona 1 μM y antimicina a 2,5 μM .

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular XFe24 en 100 μl de medio de cultivo a 37°C con 5% de CO_2 .

A las 24 horas, se retira el medio de cultivo, dejando solo 50 μl de medio.

Las células se lavaron dos veces con 500 μl de medio de ensayo (medio base XF complementado con glucosa 10 mM, glutamina 1 mM y piruvato sódico 1 mM; pH 7,4), finalmente se añade 450 μl de medio de ensayo hasta un volumen final de 500 μl . Las células fueron incubadas 37°C sin CO_2 durante 60 minutos para equilibrar con el medio de ensayo.

La oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A, se cargaron en los puertos de inyección A, B y C del cartucho sensor. Las concentraciones finales de inyección fueron: oligomicina 1 μM , FCCP 2 μM , rotenona 1 μM y antimicina A 2,5 μM . El cartucho previamente debe ser calibrado por el analizador de flujo extracelular XFe24. Se usó el protocolo de ensayo Mito-estrés celular descrito por Nicholls et al. (208). Se cuantificó la proteína de cada tipo celular mediante el método Lowry al finalizar el experimento.

M.23. Análisis de los datos del ensayo con el analizador Seahorse

Los datos del Mito-estrés fueron calculados y generados automáticamente y exportados a una hoja Excel. Las tasas de respiración y acidificación se presentan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes con 4 réplicas de cada condición en cada uno de ellos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0.01$

M.24. Generación de neuronas inducidas desde fibroblastos por reprogramación directa

Las neuronas se generaron a partir de fibroblastos de pacientes y de controles sanos mediante reprogramación directa como se describió anteriormente por Drouin-Ouellet et al. (209). Los controles y los fibroblastos derivados de pacientes se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con gelatina al 0,1% o placas de Ibidi μ -Slide 4 Well (2.8×10^4 cells / cm²).

Al día siguiente, los fibroblastos dérmicos se transfectaron con un solo vector lentiviral que contenía factores de transcripción específicos del linaje neural (Acs1 y Brn2) y dos shARN contra el complejo del factor de transcripción silenciador RE1 (REST), generado como se describió previamente (210). El plásmido fue donado por el laboratorio de la Dra. Malin Parmar (neurobiología del desarrollo y regenerativa, Universidad de Lund, Suecia). La transducción se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) de 30. El día después, las células se cambiaron a un medio de fibroblastos DMEM 4,5 % de glucosa + glutamax, 10% de FBS y 1% de penicilina y estreptomicina, durante 48 h, posteriormente el medio se reemplazó con un medio de diferenciación neural (NDiff227; Takara-Clontech) suplementado con factores de crecimiento neural y pequeñas moléculas en las concentraciones descritas anteriormente (209): LM-22A4 (2 μ M, R&D Systems), GDNF (2 ng / ml, R&D Systems), NT3 (10 ng / ml, R&D Systems), db-cAMP (0,5 mM, Sigma), CHIR99021 (2 μ M, Sigma), SB-431542 (10 μ M, sistemas de I + D), noggin (50 ng / ml, R&D Systems), LDN-193189 (0,5 M, Sigma), y sal sódica del ácido valproico (VPA; 1 mM, Sigma). La mitad del medio de diferenciación neuronal se reemplazó cada 2-3 días. Dieciocho días después de la infección de las células, el medio se reemplazó con un medio neuronal complementado solo con los factores de crecimiento hasta el final de la reprogramación. El medio se cambió cada 2-3 días durante otros 10 días. Una vez diferenciadas, las neuronas PKAN se trataron con pantotenato a 500 μ M durante 10 días. Las células neuronales fueron identificadas por la expresión de Tau o MAP2. Las células DAPI + y Tau + / MAP2 + se consideraron neuronas inducidas. La eficiencia de conversión se calculó como el número de células Tau + sobre el número total de fibroblastos sembrados para la conversión. La pureza

neuronal se calculó como el número de células Tau + sobre el total de células en la placa después de la reprogramación.

M.25. Análisis estadístico

Para el análisis de las muestras se usó un método no paramétrico, sin ninguna distribución, dado el bajo nivel de confianza de las pruebas de normalidad para el tamaño de muestra pequeño utilizado en este estudio. Para comparar los parámetros entre los grupos, las variables fueron evaluadas usando el test de Wilcoxon, test de Friedman o test ANOVA.

Todos los valores son expresados como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes se determinaron en todos los experimentos mediante la prueba t de Student; Un valor de $p < 0.01$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

RESULTADOS

R.1. Los niveles de expresión proteica de PANK2 están reducidos en los fibroblastos de los pacientes PKAN

Se analizaron los niveles de expresión de PANK2 en las líneas celulares de los fibroblastos de tres pacientes con mutaciones en PANK2 y en tres líneas de fibroblastos derivados de sujetos sanos. Dos pacientes, P1 y P2, portan mutaciones heterocigotas dobles (un alelo alberga una mutación de codón de stop y el otro una mutación sin sentido), mientras que el paciente P3 presenta una mutación homocigótica, una mutación de cambio lectura que resulta en una proteína PANK2 truncada (213). Como muestra el análisis de Western Blot en las Figuras R1a y R1b, los niveles de expresión de PANK2 (banda alrededor de 48 kDa) estaban reducidos notablemente en los pacientes P1 y P2 y prácticamente no aparecía en P3. Para compensar la deficiencia de PANK2, los niveles de expresión de PANK1 aumentaron notablemente en las tres líneas de fibroblastos mutantes. Sin embargo, los niveles de expresión de PANK3 no fueron significativamente diferentes.

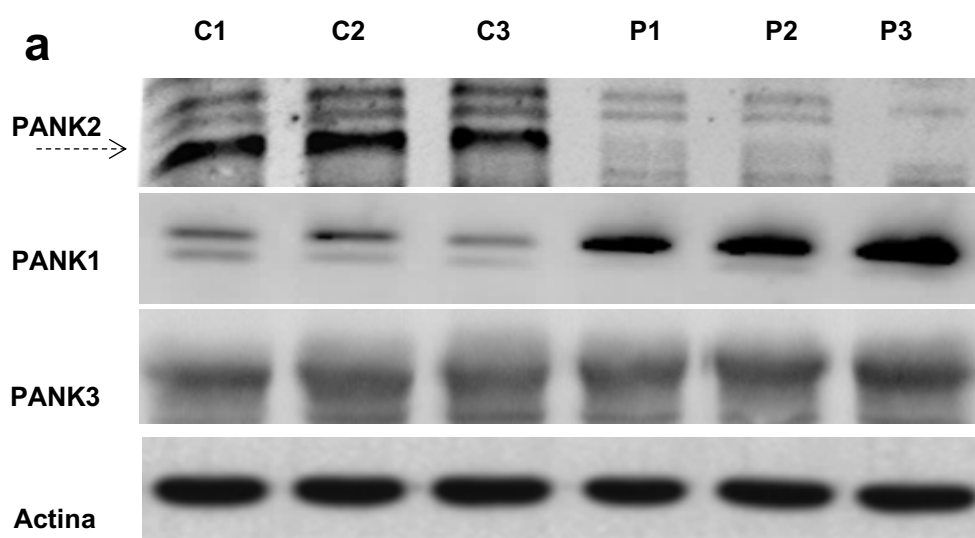


Figura R1a. Niveles de expresión proteica de PANK1, PANK2 Y PANK3 en los fibroblastos PKAN y fibroblastos control. Análisis de inmunotransferencia de extractos celulares fibroblastos control (C) y pacientes P1, P2 y P3. La flecha punteada apunta al péptido maduro PANK2 de 48,5 kDa. Actina se utiliza como control de carga.

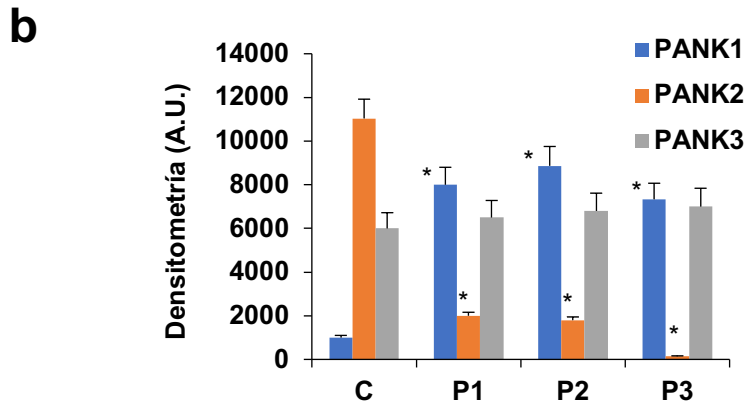


Figura R1b. Densitometría de la transferencia Western Blot referido a células control (C). Los datos son la media \pm DE de tres líneas celulares diferentes. * $p < 0.01$ entre pacientes con PKAN y controles

R.2. Los fibroblastos de pacientes PKAN muestran alteración de la morfología celular, acumulación de hierro y lipofuscina

Se examinó la morfología celular, la acumulación de hierro y lipofuscina en los fibroblastos PKAN y fibroblastos control. El examen de la morfología celular por microscopía de campo claro reveló que los fibroblastos PKAN muestran cambios morfológicos característicos que acompañan a la senescencia celular en células cultivadas (Figura R2a). El aumento del tamaño celular se cuantificó determinando el perímetro celular. Este parámetro aumentó significativamente en los fibroblastos PKAN en comparación con las células de control (Figura R2b)

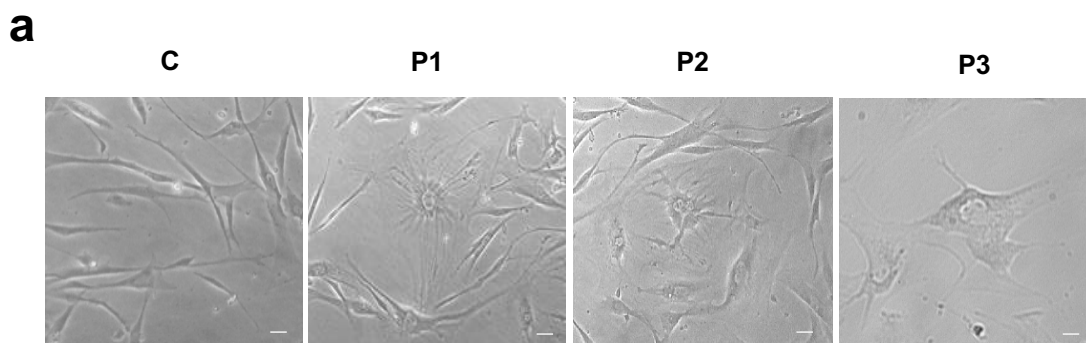


Figura R2a: Imágenes tomadas con microscopía en campo claro con el objetivo 20X. Imágenes de células control (C) y células PKAN (P1, P2 y P3). Se puede apreciar como las células PKAN presentan una morfología senescente en comparación de las células control. Barra de escala 15 μ m.

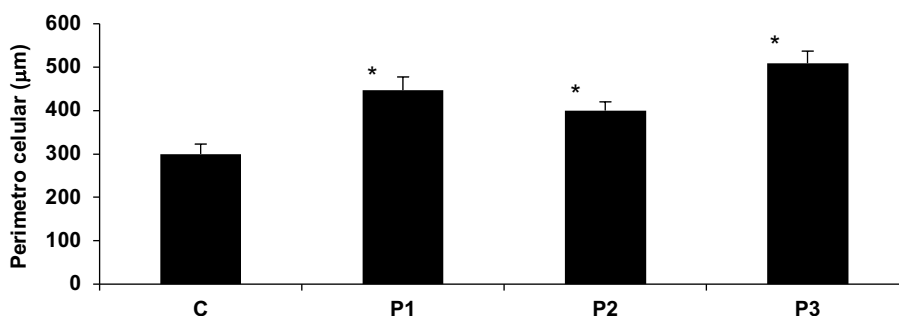
b

Figura R2b. Análisis del perímetro celular en células control, y células PKAN. * $p < 0.01$ entre pacientes PKAN y controles

Como el metabolismo del hierro alterado es una de las características principales de las mutaciones PANK2, a continuación se examinó la acumulación de hierro intracelular mediante la tinción con Azul de Prusia en tres líneas de fibroblastos control y tres líneas de fibroblastos PKAN (Figura R2c). La tinción con hierro aumentó significativamente en las células afectadas con PKAN (Figuras R2d, R2e).

Como control de la técnica se tomaron células de una enfermedad mitocondrial que no presenta acumulación de hierro. Como control negativo se utilizaron fibroblastos que albergan la mutación A8344G del síndrome de MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas), una enfermedad mitocondrial con afectación neurológica pero sin acumulación de hierro, así como los fibroblastos P1 tratados con deferiprona, un fármaco quelante de hierro. Posteriormente, para confirmar el contenido anormal de hierro celular en los fibroblastos PKAN se determinó los niveles de hierro intracelular mediante el ensayo colorimétrico de la Ferrozina (214). Los fibroblastos derivados de los pacientes PKAN mostraron un aumento en los niveles totales de hierro (Figura R2f). Los niveles de hierro en los fibroblastos control fueron aproximadamente de 50 nmol Fe/ mg de proteína, mientras que el contenido de hierro en los fibroblastos PKAN estaban en el rango de 80-120 nmol Fe/ mg de proteína.

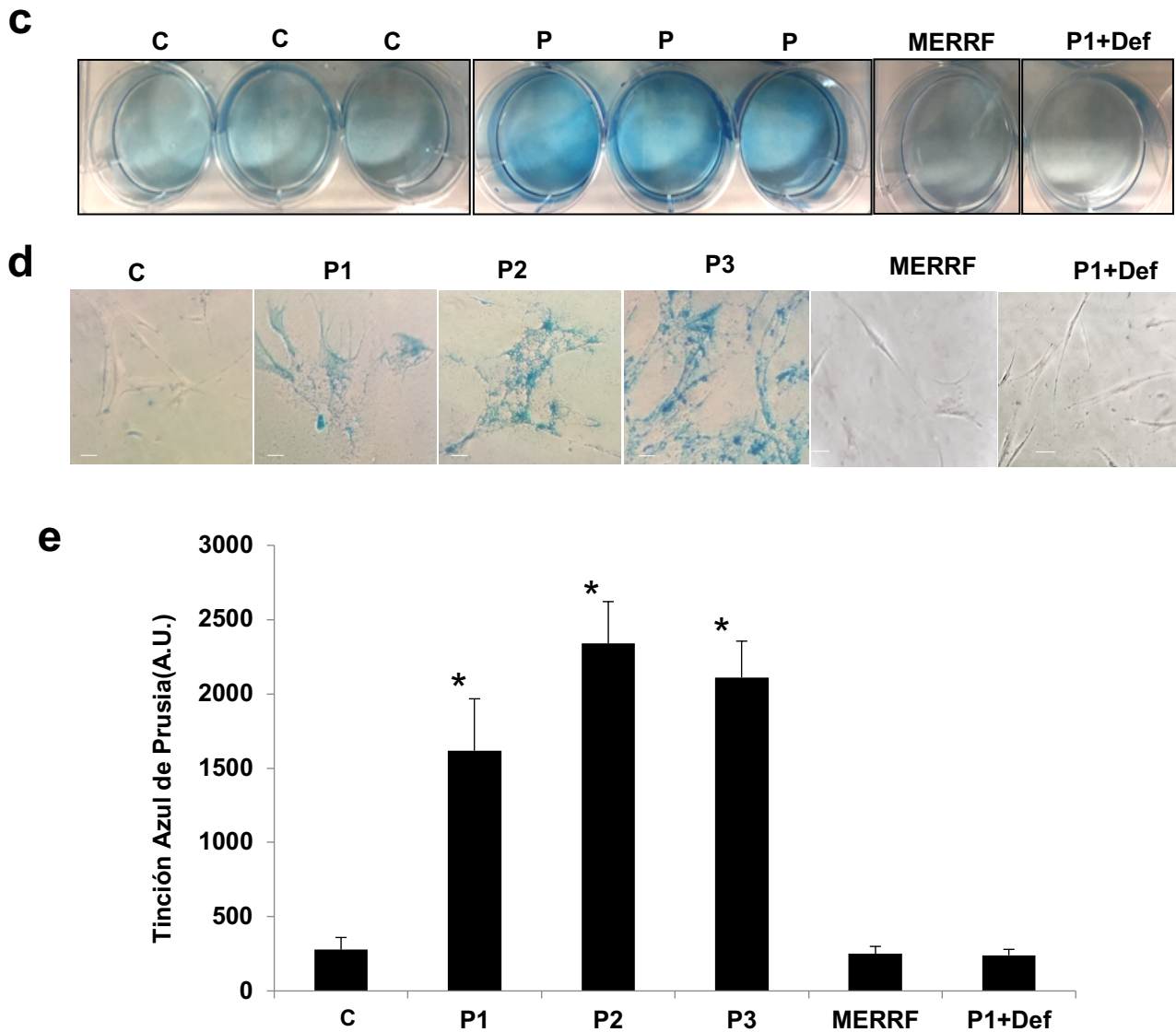


Figura R2c: Tinción con Azul de Prusia de 3 líneas celulares control (C1, C2 y C3) y fibroblastos PKAN (P1, P2, P3). R2d. Imágenes realizadas en campo claro con aumento al 20X de control (C1) y pacientes P1, P2 y P3 después de la tinción con Azul de Prusia. Los fibroblastos que albergan la mutación MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares) A8344G, una enfermedad mitocondrial no relacionada, así como los fibroblastos P1 tratados con deferiprona (Def) 100 μ M durante 96 h se usaron como control negativo. Barra de escala = 15 μ m. R2e. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos separados. * $p < 0.01$ entre pacientes PKAN y controles. AU, unidades arbitrarias

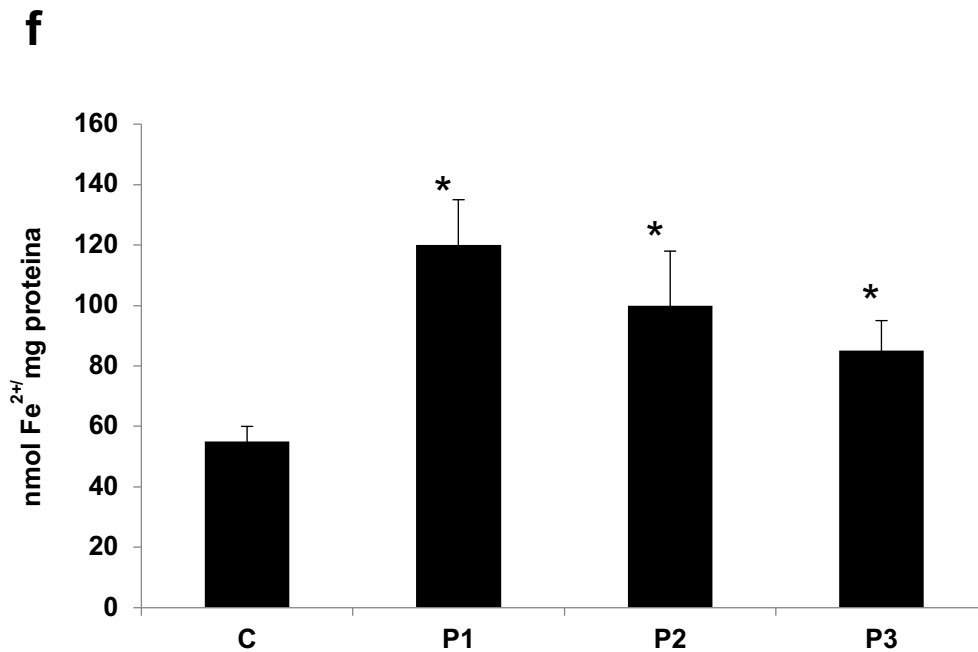


Figura R2f: Determinación del contenido de hierro en los fibroblastos control (C) y PKAN mediante el ensayo de Ferrozina. Las células control presentaban un contenido de hierro más bajo que las células PKAN. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos separados. * $p < 0.01$ entre control y pacientes con PKAN. Los valores de control representan medias \pm DE para tres líneas celulares de fibroblastos de control.

La acumulación anormal de lipofuscina en pacientes con NACH ha sido descrita ya por varios autores (216). La acumulación de lipofuscina puede resultar de la peroxidación lipídica, un proceso estimulado por el hierro (217). Se determinó la presencia de lipofuscina mediante la tinción Negro Sudán, análisis de autofluorescencia, y análisis de microscopía electrónica en fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Las células mutantes PKAN mostraron una mayor tinción con Negro Sudán y un aumento de la autofluorescencia en comparación con las células de control sugiriendo una acumulación de lipofuscina (Figuras R2g, R2h)

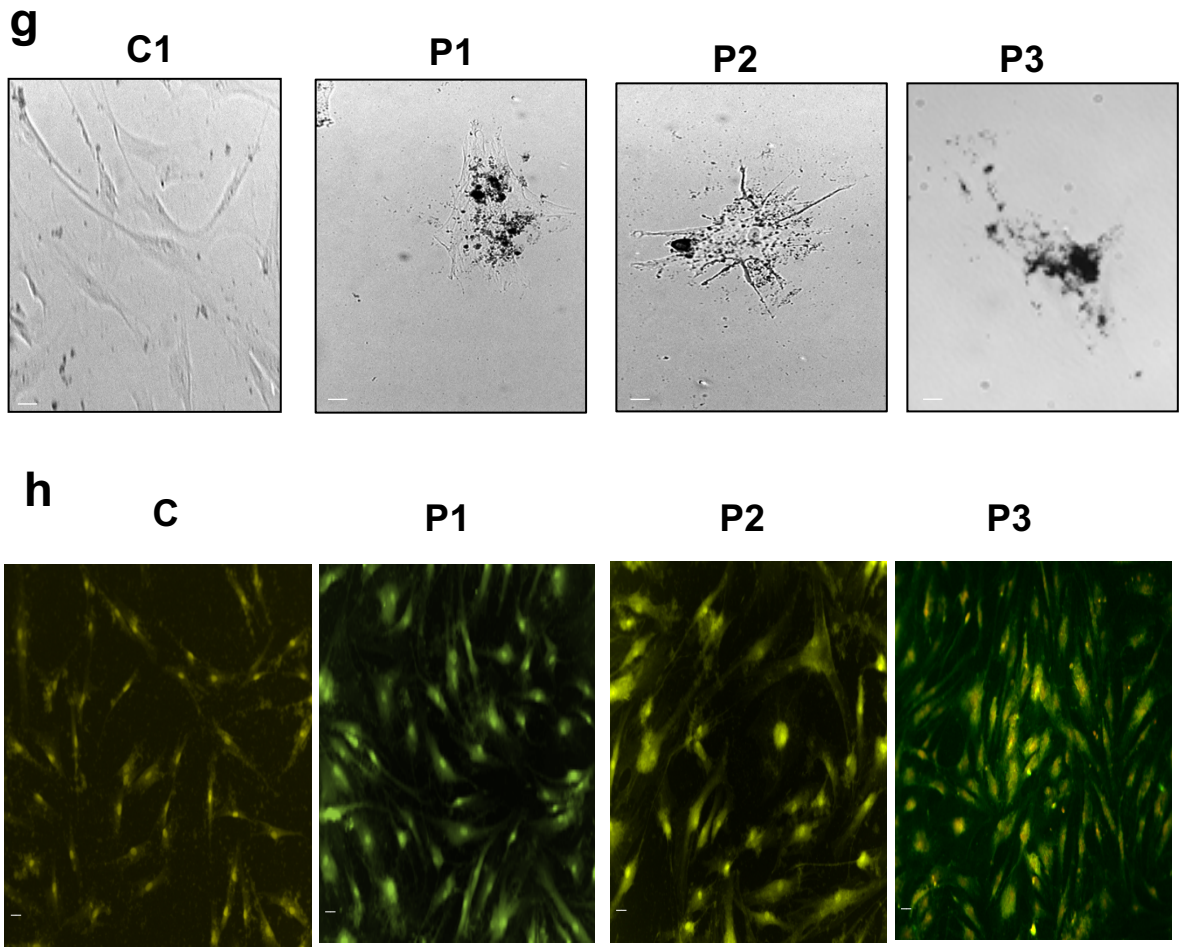


Figura R2g. Acumulación de lipofuscina en fibroblastos PKAN detectados por la tinción Negro Sudán. Barra de escala = 30 μm R2h. Imágenes representativas de autofluorescencia en fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1, P2, P3), donde las células PKAN presentaban más autofluorescencia que las células control por la acumulación de lipofuscina. Barra de escala = 15 μm .

El aumento de los gránulos de lipofuscina intracelular en fibroblastos PKAN se confirmó mediante un examen de microscopía electrónica (Figura R2i). La cuantificación de la autofluorescencia, la tinción Negro Sudán y los gránulos de lipofuscina se muestran en las Figuras R2j, R2k)

i

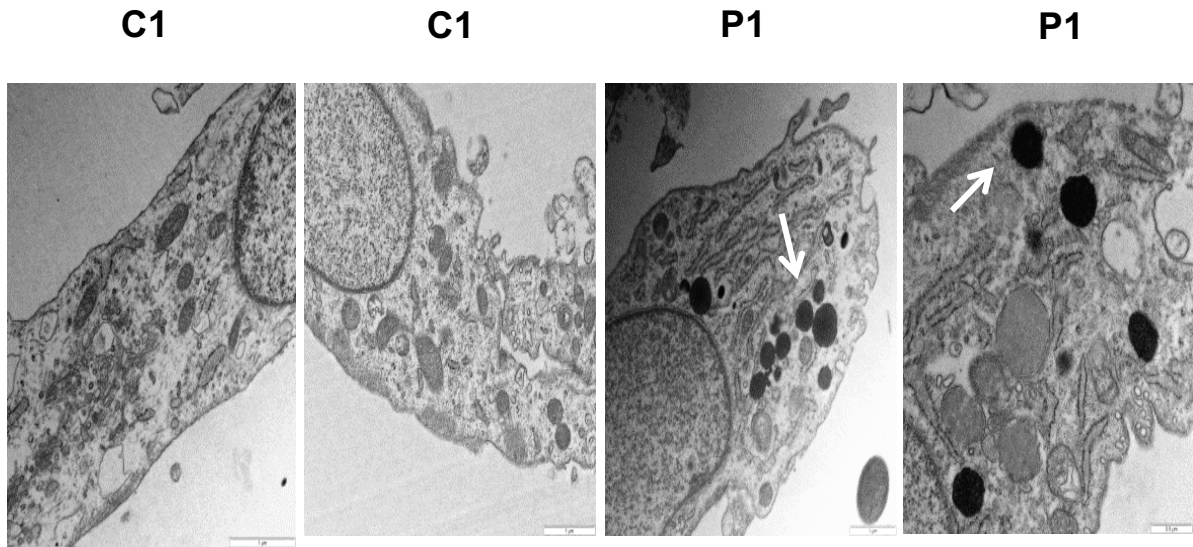


Figura R2i: Imágenes de microscopía electrónica de células control (C1) y fibroblastos P1. En las células PKAN se observan los gránulos de lipofuscina. Flechas blancas, gránulos de lipofuscina. Barra de escala = 1 μ m y 0.5 μ m.

j

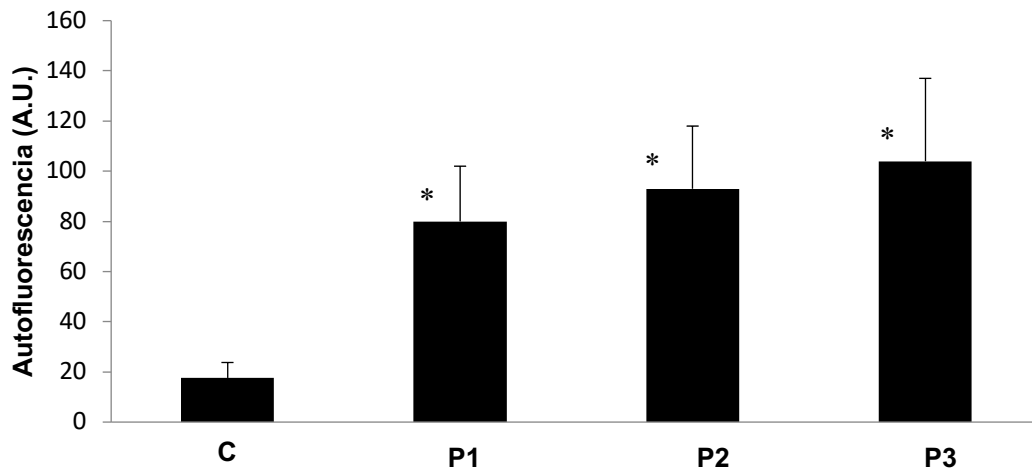


Figura R2j: Cuantificación de la autofluorescencia en los fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN por análisis de imagen utilizando el software Image J.

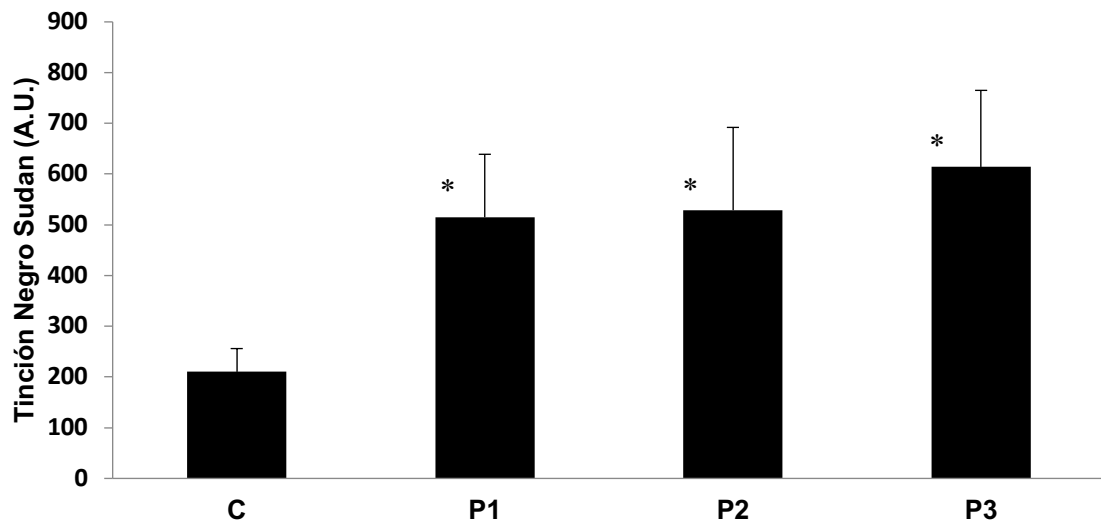
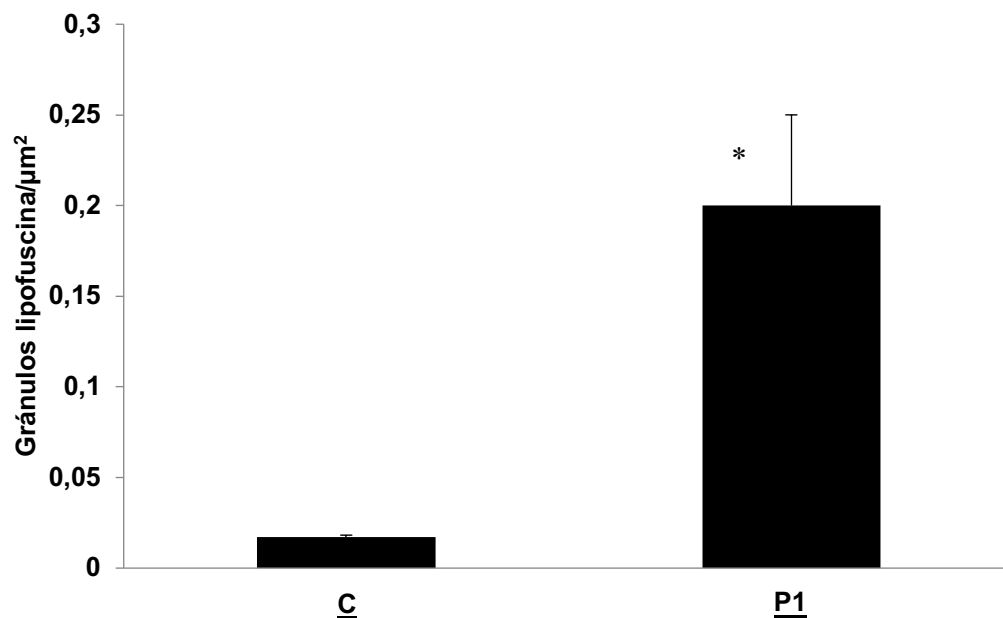
k**l**

Figura R2k. Cuantificación de la tinción Negro Sudán de los fibroblastos control y PKAN mediante análisis de imagen utilizando el software Image J. **R2l.** Cuantificación de gránulos de lipofuscina en imágenes de microscopía electrónica en fibroblastos control y fibroblastos PKAN procedentes del P1. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. A.U., unidades arbitrarias.

La autofluorescencia en los fibroblastos de los pacientes se redujo significativamente después del tratamiento con deferiprona, lo que sugiere que el hierro contribuye a la acumulación del material autofluorescente similar a la lipofuscina (Figura R2m)

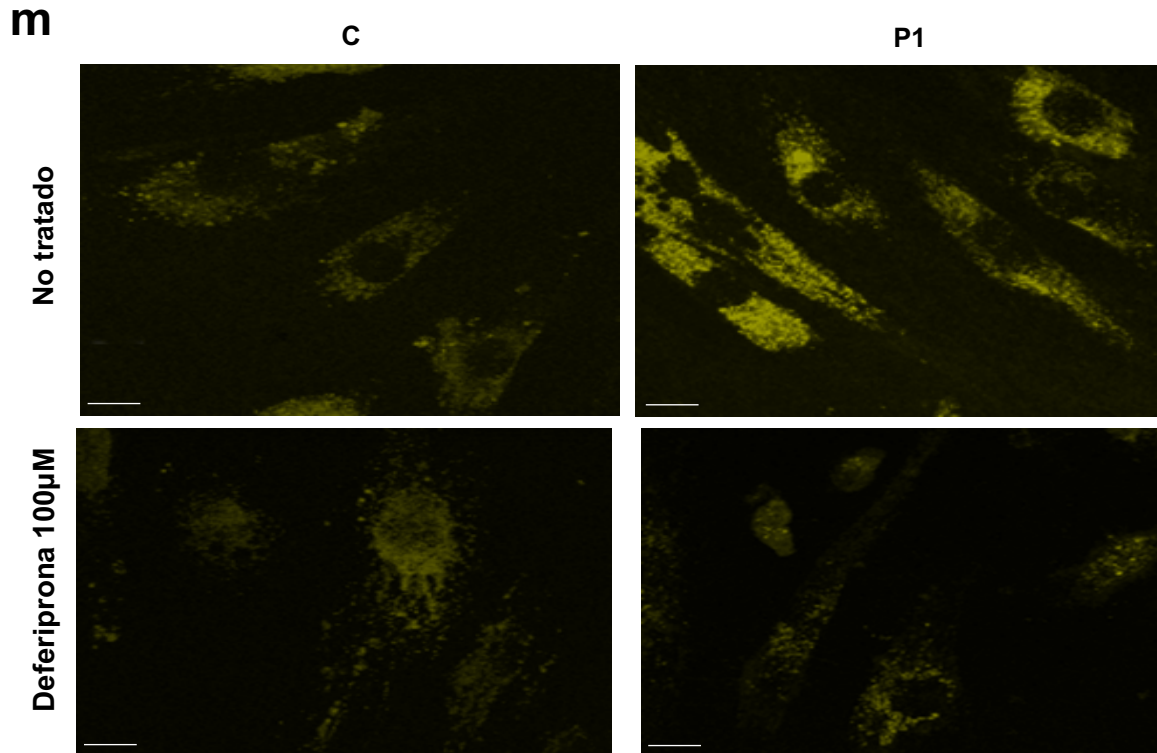


Figura R2m. Imágenes representativas de autofluorescencia en células control (C) y fibroblastos PKAN (P1) sin tratar y tratados con deferiprona (Def) 100 μ M durante 96 horas. Barra de escala = 15 μ m.

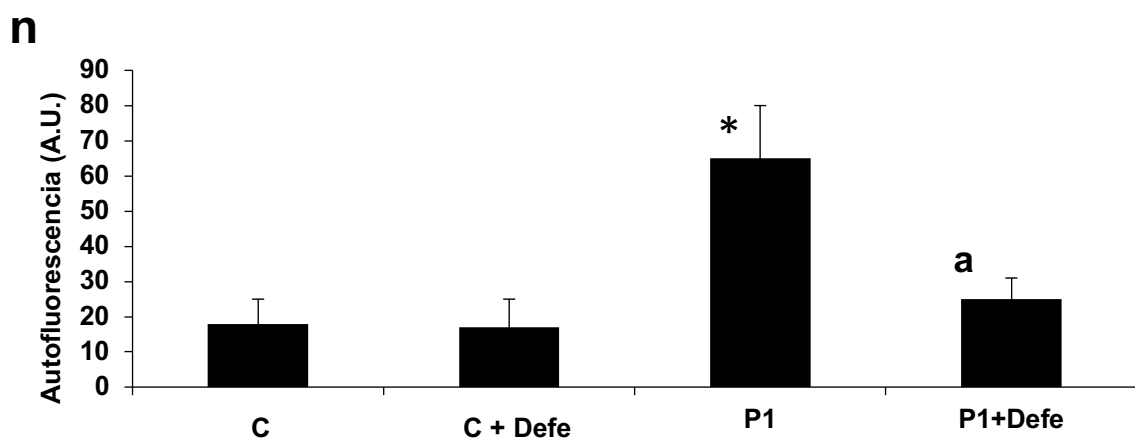


Figura R2n. Cuantificación de autofluorescencia por análisis de imagen utilizando el software Image J. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $P < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados. A.U., Unidades Arbitrarias

A continuación, para confirmar las características de los gránulos observados, se analizaron sus características espectrales mediante microscopía confocal láser de barrido. Con la excitación de 405 nm, los gránulos de lipofuscina mostraron un pico de emisión a 510–520 nm (Figura R2o). Estos espectros observados son consistentes con las características espectrales de los gránulos de lipofuscina obtenidos por Bindewald-Wittich et al. en las células epiteliales del pigmento retiniano mediante microscopía confocal (218).

O

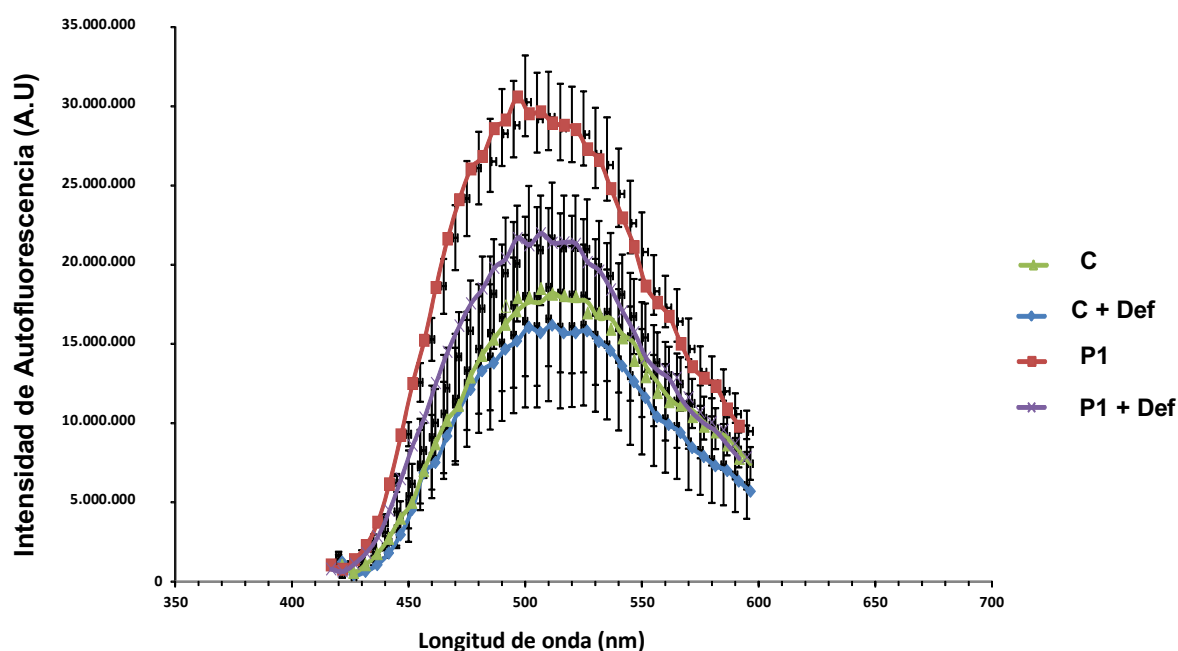


Figura R2o: Representación de los espectros de autofluorescencia de los gránulos de lipofuscina medidos por microscopía confocal laser en fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1) sin tratar y tratados con deferiprona 100 μ M (Def) durante 96 horas. Las células PKAN mostraron más cantidad de gránulos de lipofuscina que las células control (C). Tras el tratamiento con deferiprona se redujeron significativamente dichos gránulos. Fuente láser de excitación: 405 nm. Los espectros de emisión se registraron en 10 gránulos de lipofuscina en 20 células. Los resultados se expresan como la media \pm DE de intensidad de autofluorescencia. ANOVA análisis: $p < 0.001$ entre C y P1; $p < 0.05$ entre P1 y P1 + Deferiprona.

La SEM/EDX, es un método de microanálisis elemental ampliamente aplicado capaz de identificar todos los elementos en la tabla periódica excepto H, He y Li (219). Esta técnica se usó para determinar la composición química de la lipofusina aislada de los fibroblastos P1. El microanálisis de EDX de alta precisión reveló que los gránulos de lipofusina contienen una fracción de alto peso de hierro (alrededor del 5%) (Figura R2p y Tabla R1a). En la Tabla R1b muestra un análisis cuantitativo de los espectros EDX de cuatro gránulos de lipofusina.

p

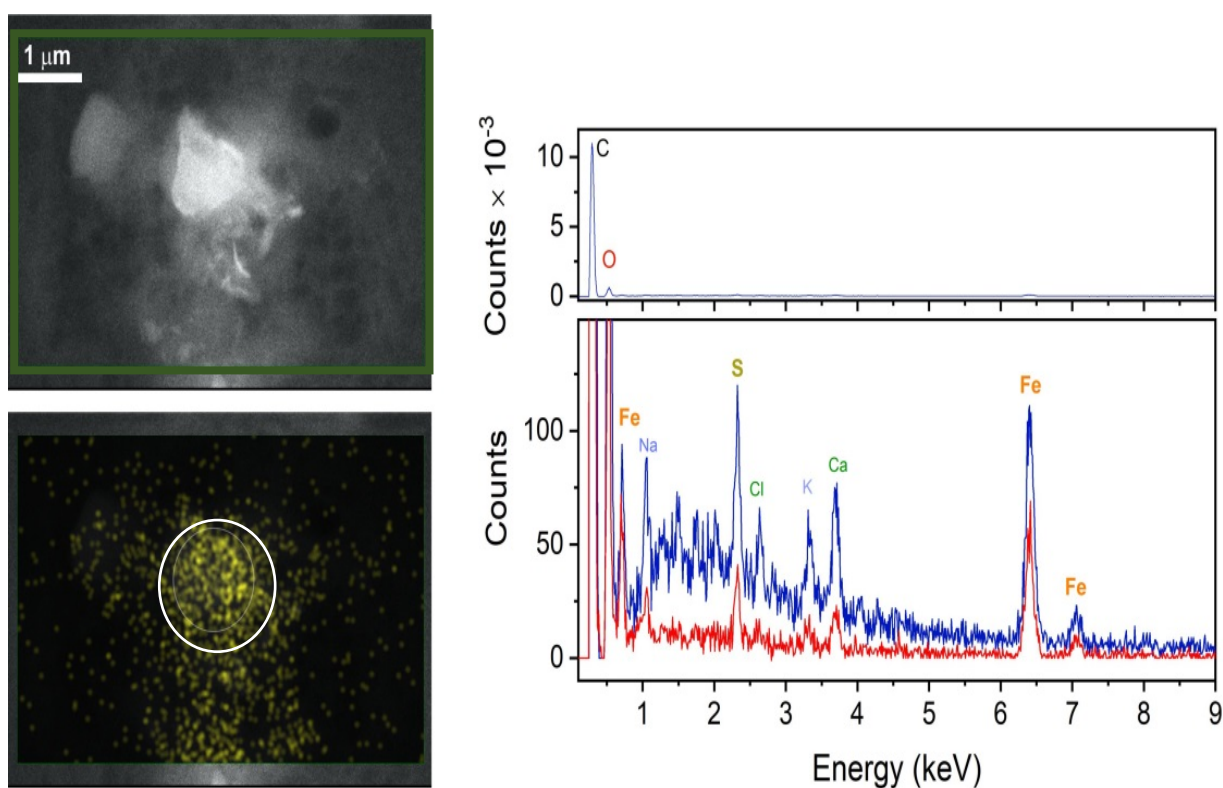


Figura R2p: Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM / EDX) de un gránulo de lipofusina aislado. La energía primaria del haz de electrones se ajustó a 20 kV. Arriba a la izquierda, imagen de una región seleccionada (cuadrado verde), abajo a la izquierda, superposición del mapa elemental asociado a la energía de transición Fe K α . El círculo blanco representa un punto seleccionado para el análisis. Derecha, espectros EDX de la región general (espectro azul, ventana cuadrada verde en el panel superior izquierdo) y el punto seleccionado (espectro rojo). La presencia de emisión de rayos X en las energías de transición Fe L β 1 / α 12, K α y K β está marcada en naranja.

Tabla R1a: Cuantificación del espectro EDX

Element	C	O	S	Fe	Ca	Na	K	Cl
Mole fraction (at%)	89.76	6.95	0.45	1.22	0.78	0.40	0.26	0.16
Weight fraction (wt%)	81.14	8.38	1.08	5.14	2.36	0.69	0.78	0.42

Tabla R1b: Análisis cuantitativo del espectro de EDX de cuatro gránulos de lipofusina. Los resultados están expresados como la media \pm DE.

Element	wt%	SD	at%	SD
C	81.58	6.57	89.97	2.85
O	8.18	0.89	6.81	1.04
S	1.03	0.17	0.43	0.09
Fe	5.51	3.5	1.33	0.90
Ca	1.53	0.89	0.51	0.30
Na	0.69	0.19	0.4	0.13
K	0.74	0.39	0.25	0.14
Cl	0.75	0.57	0.29	0.23

Mole fraction (at%)

Weight fraction (wt%)

R.3. EL tratamiento con pantotenato restaura la morfología celular y reducción de la acumulación de hierro / lipofusina en los fibroblastos derivados de pacientes PKAN según el tipo de mutación PANK2

Para examinar si se podía estabilizar la enzima PANK2 residual y corregir las alteraciones patológicas en los fibroblastos PKAN, las células control y afectadas se trataron con una concentración creciente de pantotenato (50–500 μ M) para examinar la morfología celular y la acumulación de hierro y lipofusina. Tal como se ilustra en las Figuras R3a, R3b, el tratamiento con pantotenato a 500 μ M redujo drásticamente la acumulación de hierro en los pacientes 1 y 2 (P1 y P2) pero no en el paciente 3 (P3) en el que la expresión de PANK2 está totalmente ausente y la mutación produce una proteína truncada.

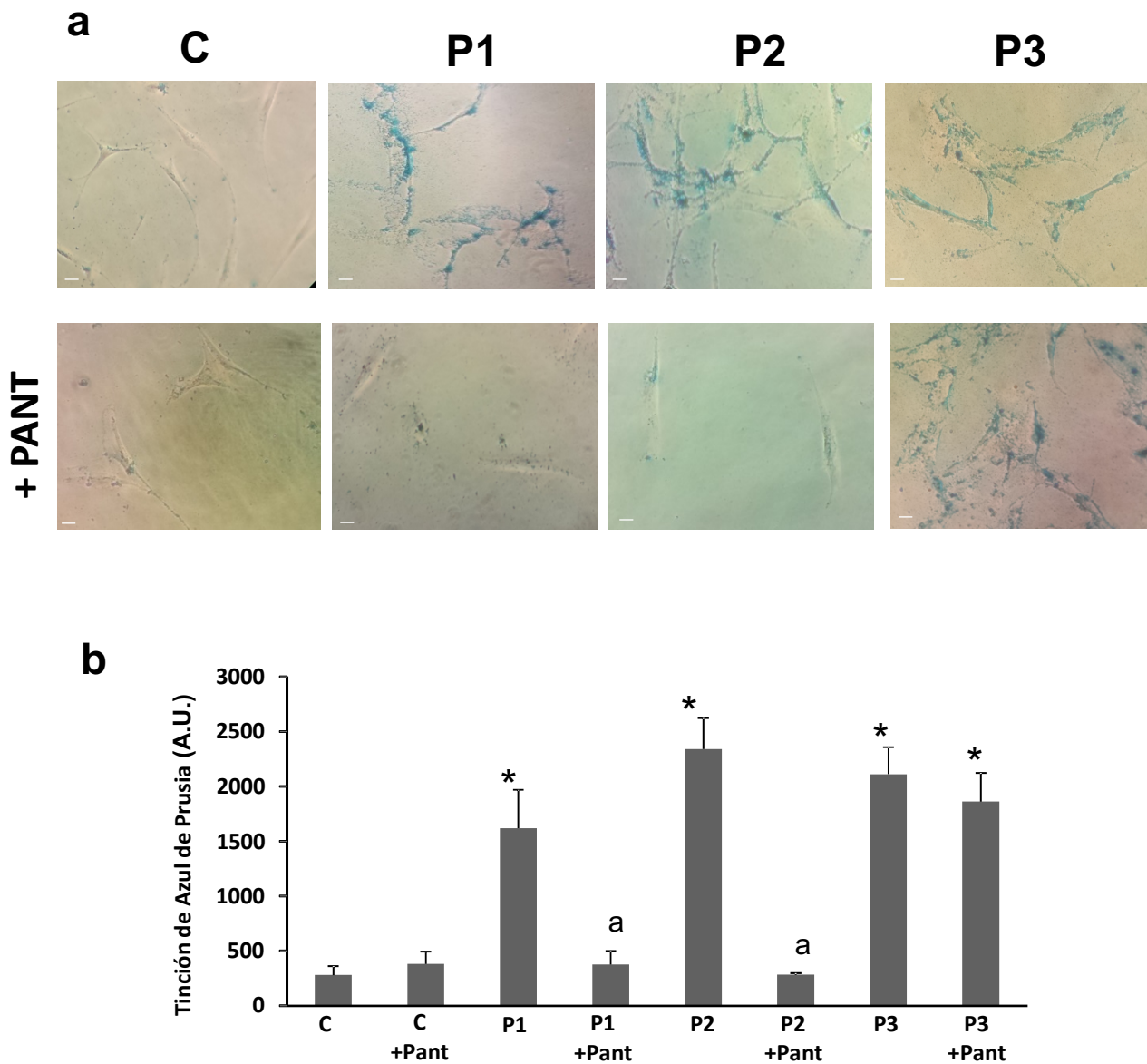


Figura R3a. Efecto del tratamiento con pantotenato a 500 μ M sobre la acumulación de hierro. Células control (C) y fibroblastos PKAN (P1, P2 y P3) tratados con pantotenato durante 20 días. Posteriormente, las células se tiñeron con Azul de Prusia y se examinaron por microscopía de campo claro. Barra de escala = 15 μ m. R3b. El software Image J analizó la cuantificación de las imágenes de tinción con Azul de Prusia. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas A.U., Unidades Arbitrarias

En los fibroblastos respondedores al pantotenato, el efecto del tratamiento fue dependiente de la dosis y el tiempo (Figura R3c).

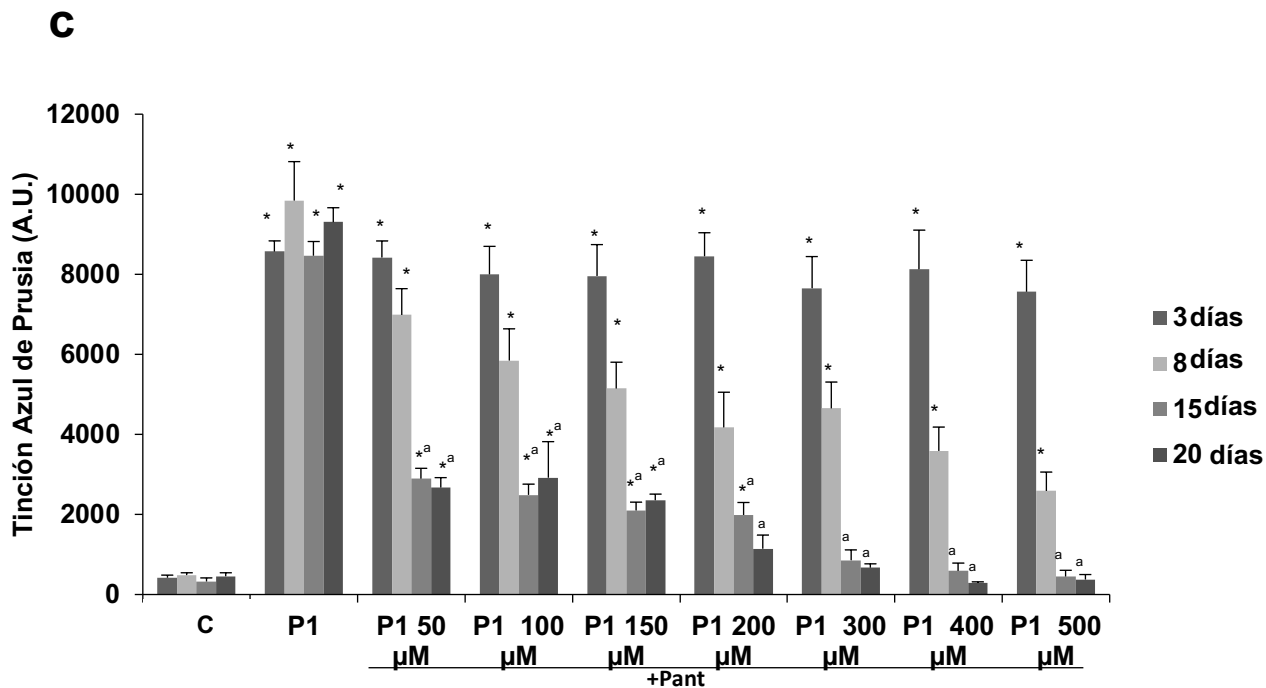


Figura R3c. Cuantificación de la tinción de Azul de Prusia en células control (C) y un paciente PKAN respondedor (P1) tras la incubación con concentraciones crecientes de pantotenato (50–500 μM) durante 3–20 días. Las imágenes fueron analizadas por el software ImageJ., * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas A.U., Unidades Arbitrarias

Para corroborar estos resultados, el contenido de hierro intracelular se determinó mediante el ensayo de Ferrozina (Figura R3d) y el ensayo de ICP-MS (Figura R3e).

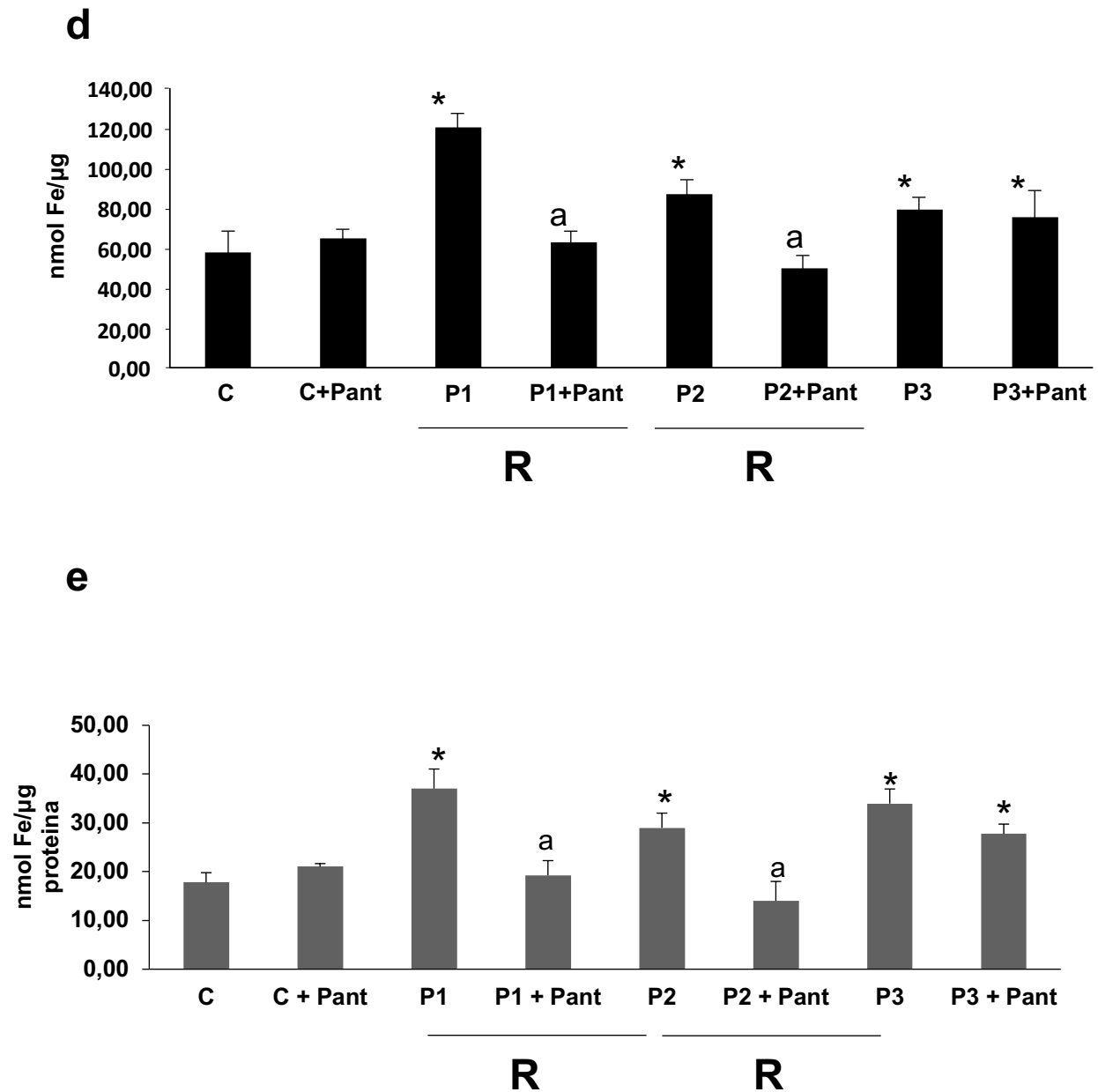


Figura R3d. Contenido total de hierro en fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN. El contenido de hierro fue determinado por el ensayo de la Ferrozina. Los fibroblastos control y los fibroblastos del paciente se incubaron con pantotenato durante 20 días. R3e. Contenido de hierro determinado por ICP-MS. El contenido total de hierro en fibroblastos control y PKAN se determinó mediante ICP-MS. Para las células control, los datos son la media \pm DE para los experimentos realizados en tres líneas celulares de control diferentes. Los datos de pacientes representan la media \pm DE de tres experimentos separados. * $p < 0.05$ entre células control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas. R= fibroblastos respondedores al pantotenato.

La morfología celular alterada en fibroblastos PKAN también se corrigió con el tratamiento con pantotenato en las células afectadas respondedoras, P1 y P2, pero no en el paciente P3 (Figuras R3f, R3g).

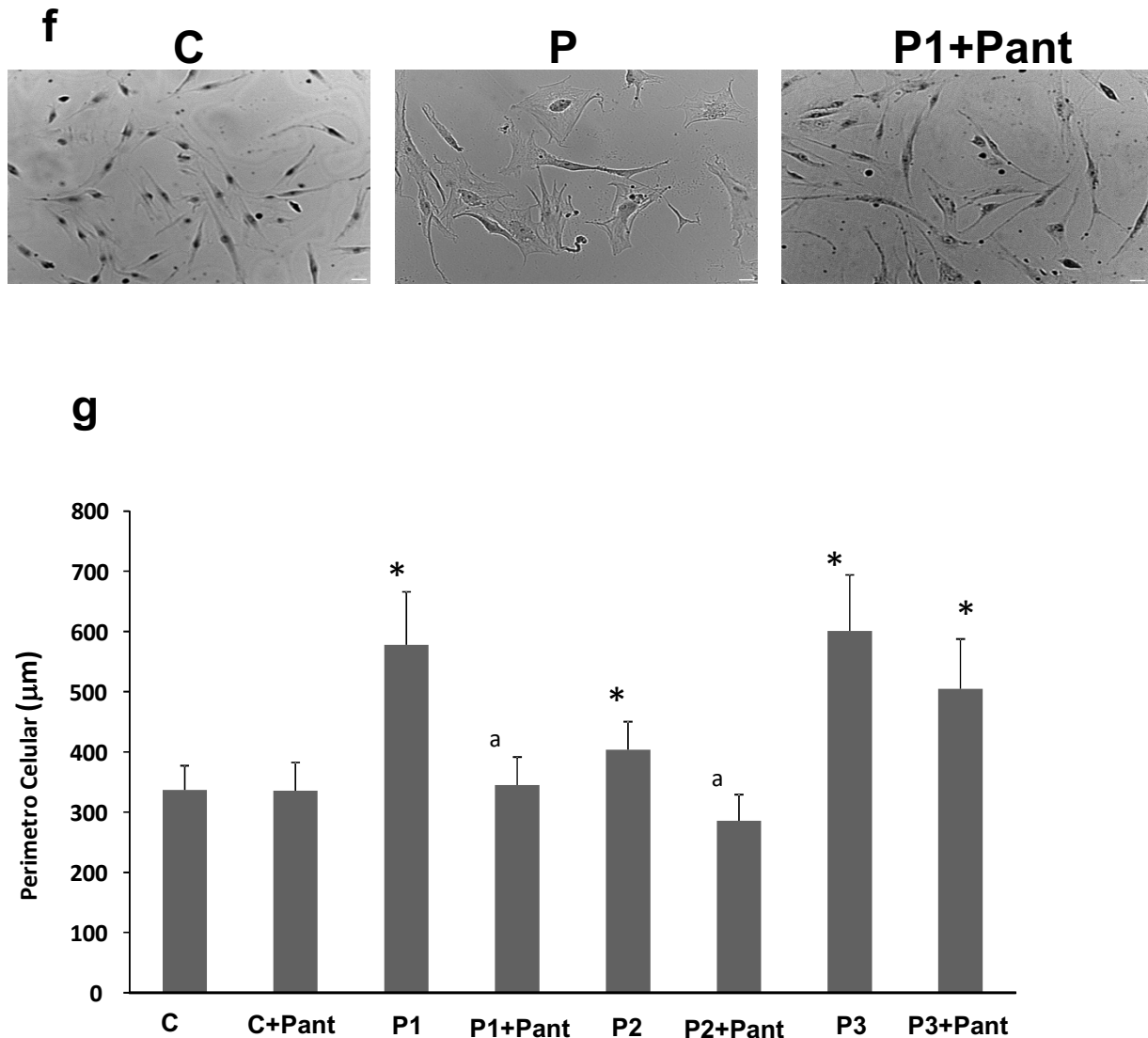


Figura R3f. Morfología celular de fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Imágenes representativas de microscopía óptica de control (C) y fibroblastos PKAN (P1) después del tratamiento con pantotenato (Pant) 500 μ M durante 20 días. Barra de escala = 15 μ m. R3g. Perímetro celular de fibroblastos control y fibroblastos PKAN. El perímetro celular de fibroblastos control (C) y los fibroblastos PKAN (P1, P2 y P3) se determinó utilizando el software Image J. * $p < 0.01$ entre células control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas. R = fibroblastos respondedores al Pantotenato.

Del mismo modo, el tratamiento con pantotenato corrigió los niveles de autofluorescencia (Figuras R3h, R3i) y la eliminación de la lipofuscina (Figura R3j) en los pacientes P1 y P2, pero no teniendo el mismo efecto en el P3.

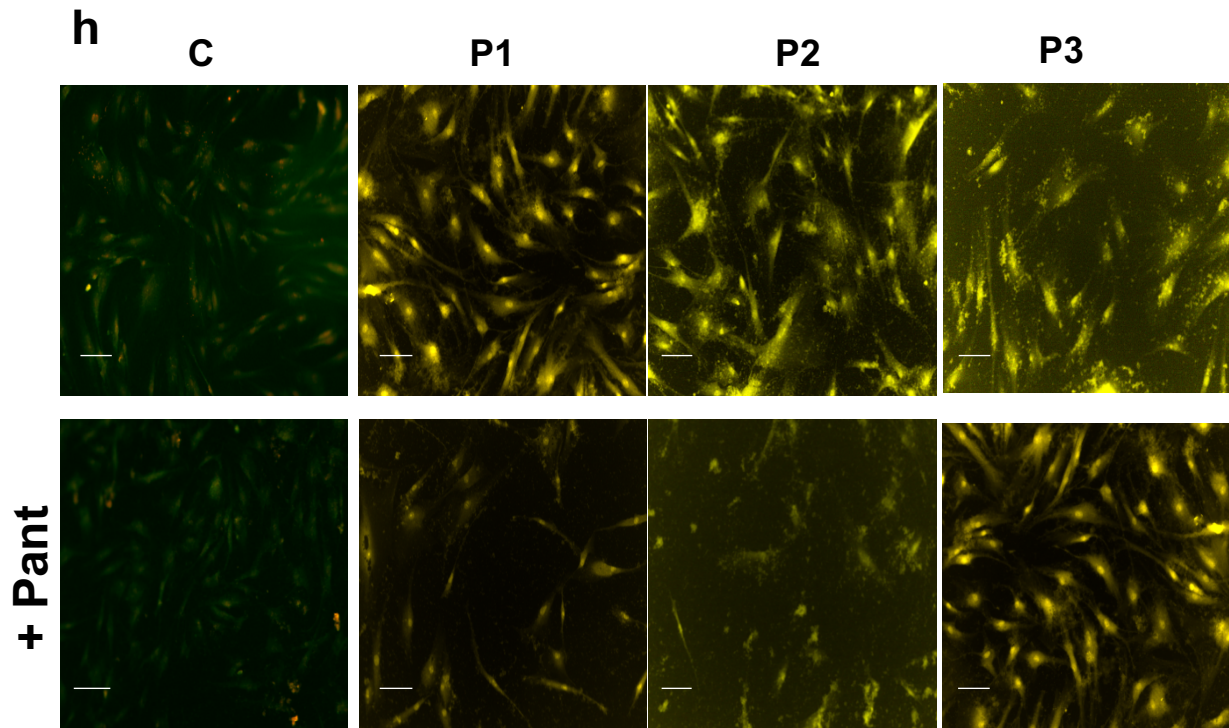


Figura R3h. Imágenes de autofluorescencia de fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1, P2 y P3) sin tratar y tratados con pantotenato (Pant) durante 20 días. Barra de escala = 15 μ m.

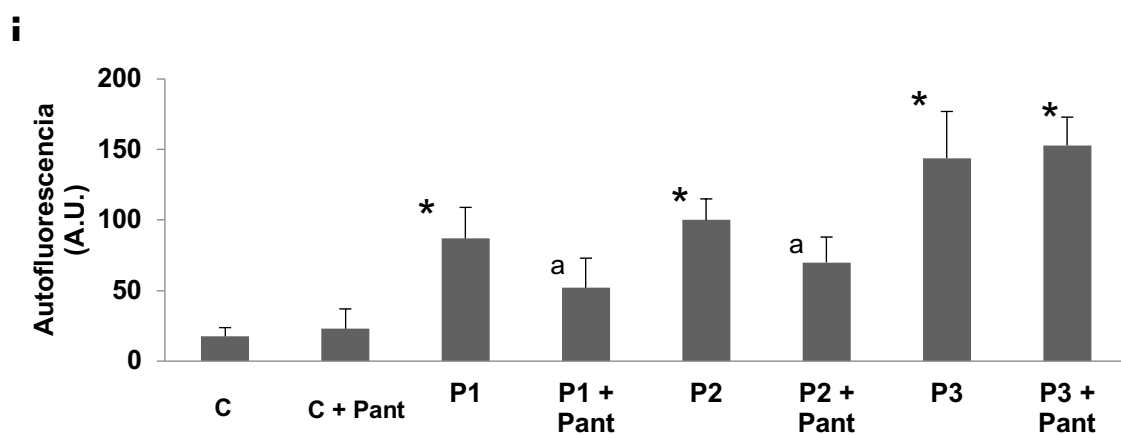


Figura R3i. Cuantificación de autofluorescencia mediante análisis de imagen utilizando el software Image J. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas

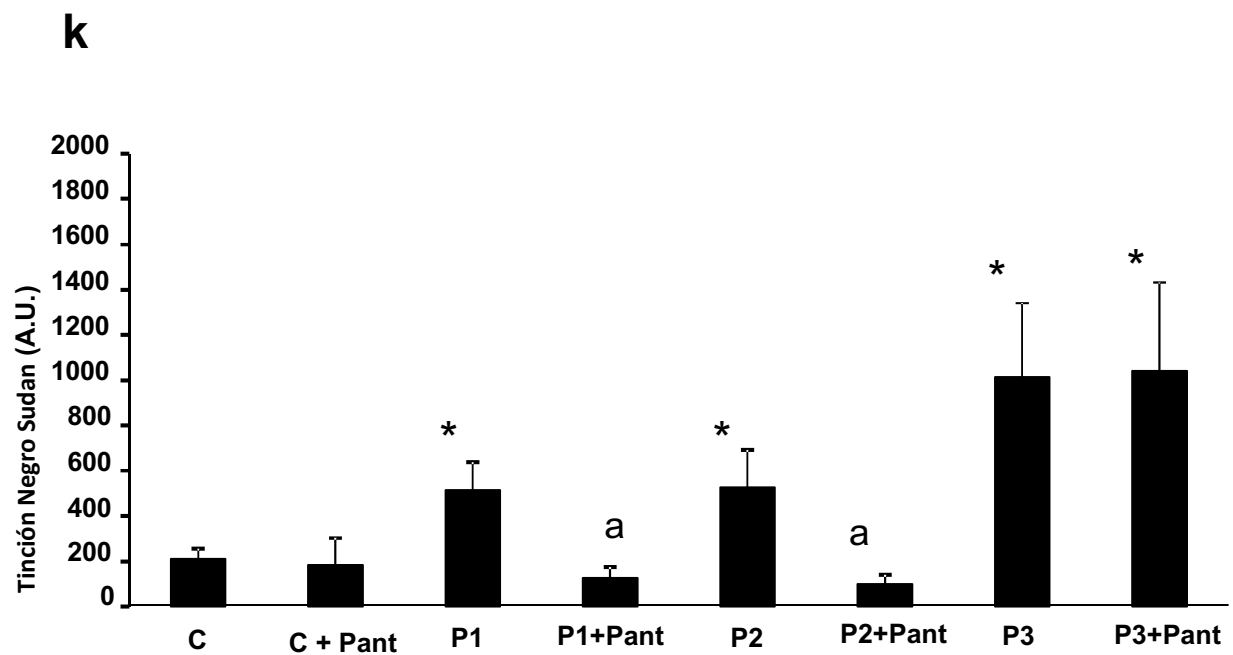
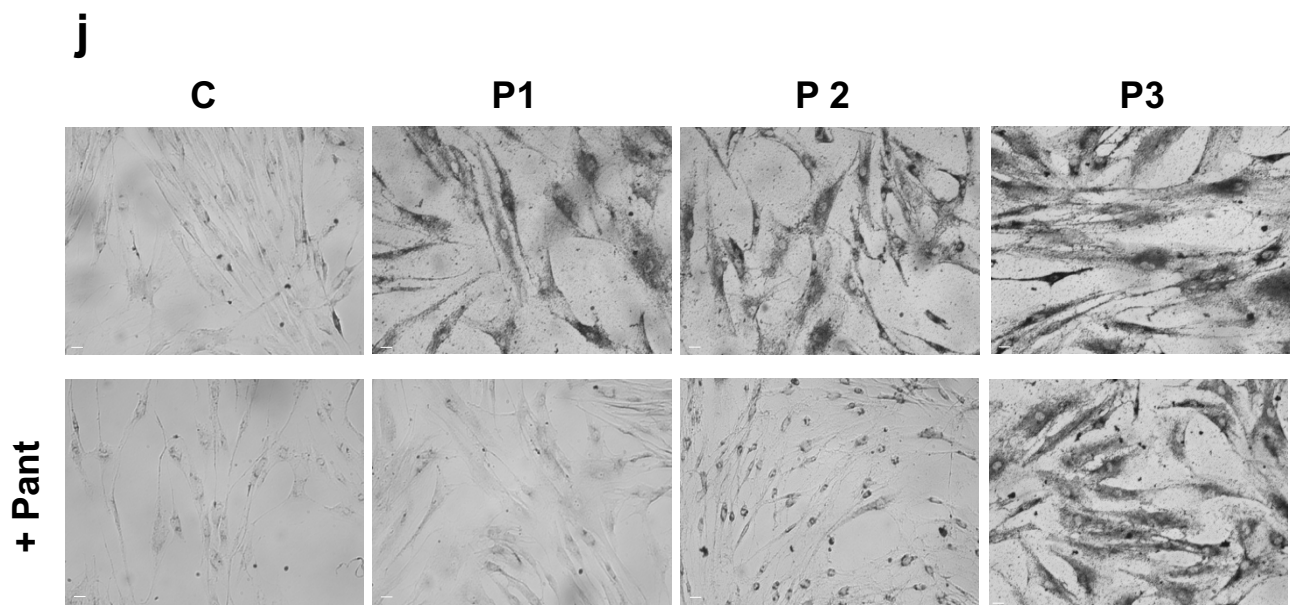


Figura R3j. Fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1, P2, P3) tratados con pantotenato durante 20 días. Las imágenes muestran la tinción de Negro Sudán. Barra de escala = 15 μ m. R3k. Cuantificación de la tinción de Negro de Sudán mediante análisis de imagen utilizando el software Image J. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos * $P < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $P < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas. A.U., Unidades arbitrarias

La efectividad del tratamiento con pantotenato también se confirmó mediante microscopía óptica y electrónica en células derivadas del paciente 1 (Figuras R3l, R3m).

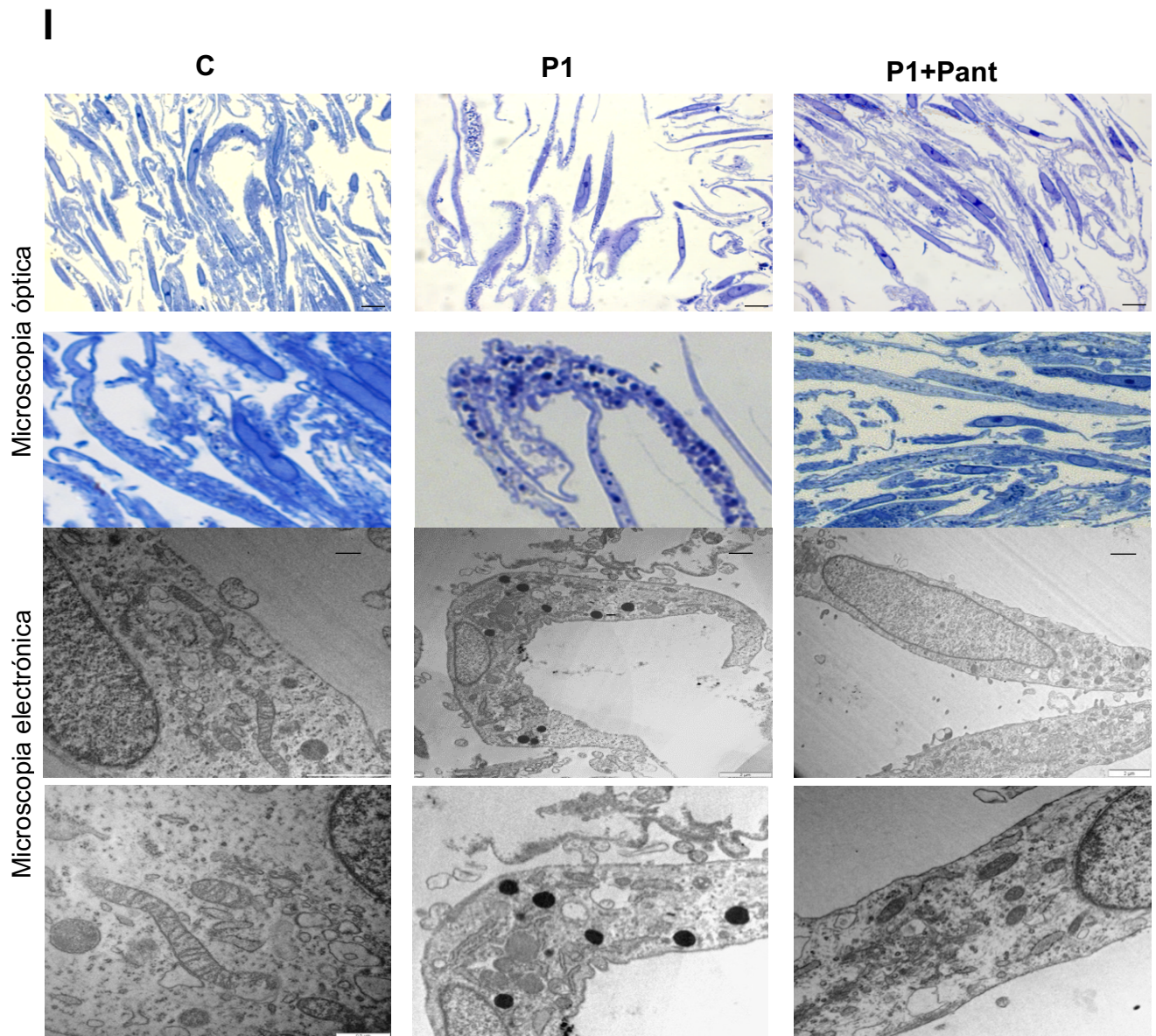


Figura R3l. Semisección y análisis de microscopía electrónica en fibroblastos control (C) y PKAN. Los fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1) fueron tratados con pantotenato durante 20 días. Imágenes representativas de secciones de semifinas de 1 μm teñidas con azul de toluidina y visualizadas con un microscopio óptico. Barra de escala = 15 μM . También se pueden observar las imágenes representativas de microscopía electrónica de control (C) y fibroblastos PKAN (P1) Barra de escala del panel superior = 0.2 μm ; panel inferior = 0.5 μm

m

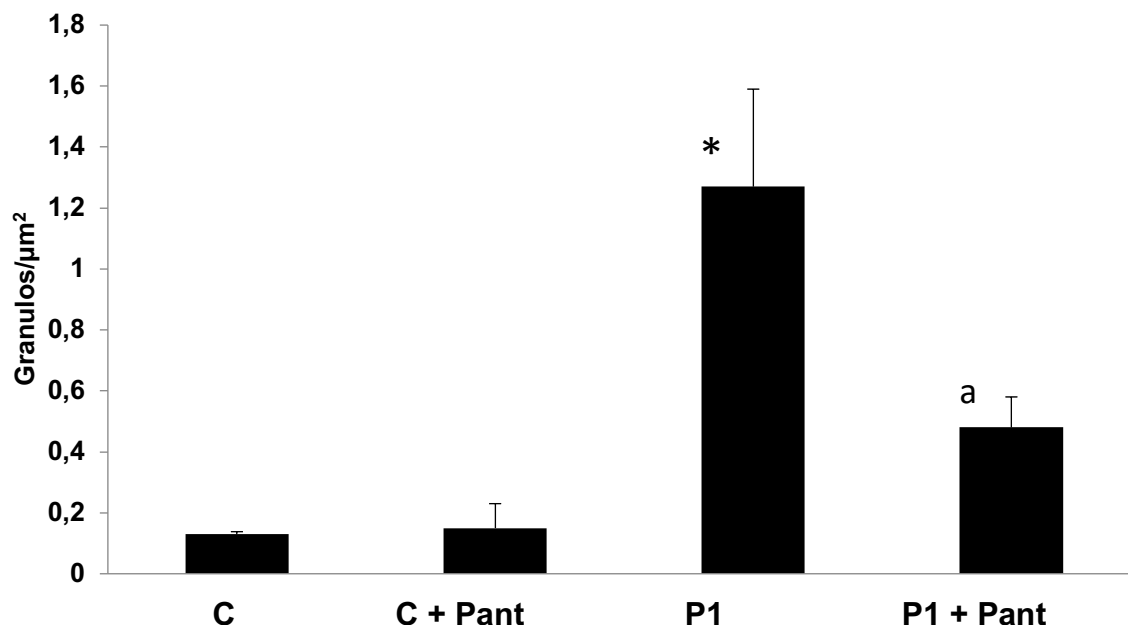


Figura R3m. Cuantificación de gránulos de lipofuscina. Los gránulos de lipofuscina se cuantificaron en células control y fibroblastos PKAN. Los fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN (P1) fueron tratados con pantotenato durante 20 días. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados.

R.4. El tratamiento con pantotenato previene la carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica mitocondrial en fibroblastos PKAN respondedores

Se determinó el estado oxidativo celular y su relación con la respuesta al tratamiento con pantotenato en fibroblastos control y fibroblastos PKAN. El contenido de proteínas carboniladas de los extractos celulares tratados con pantotenato y no tratados, se evaluó mediante el ensayo Oxyblot, que nos confirma las proteínas carboniladas (Figuras R4a y R4b). Los resultados confirmaron que los fibroblastos PKAN no tratados mostraron un aumento en los niveles de proteínas carboniladas en comparación con las células control, y que el tratamiento con pantotenato fue capaz de reducir las proteínas carboniladas en los fibroblastos P1 y P2 respondedores, pero no en los fibroblastos P3

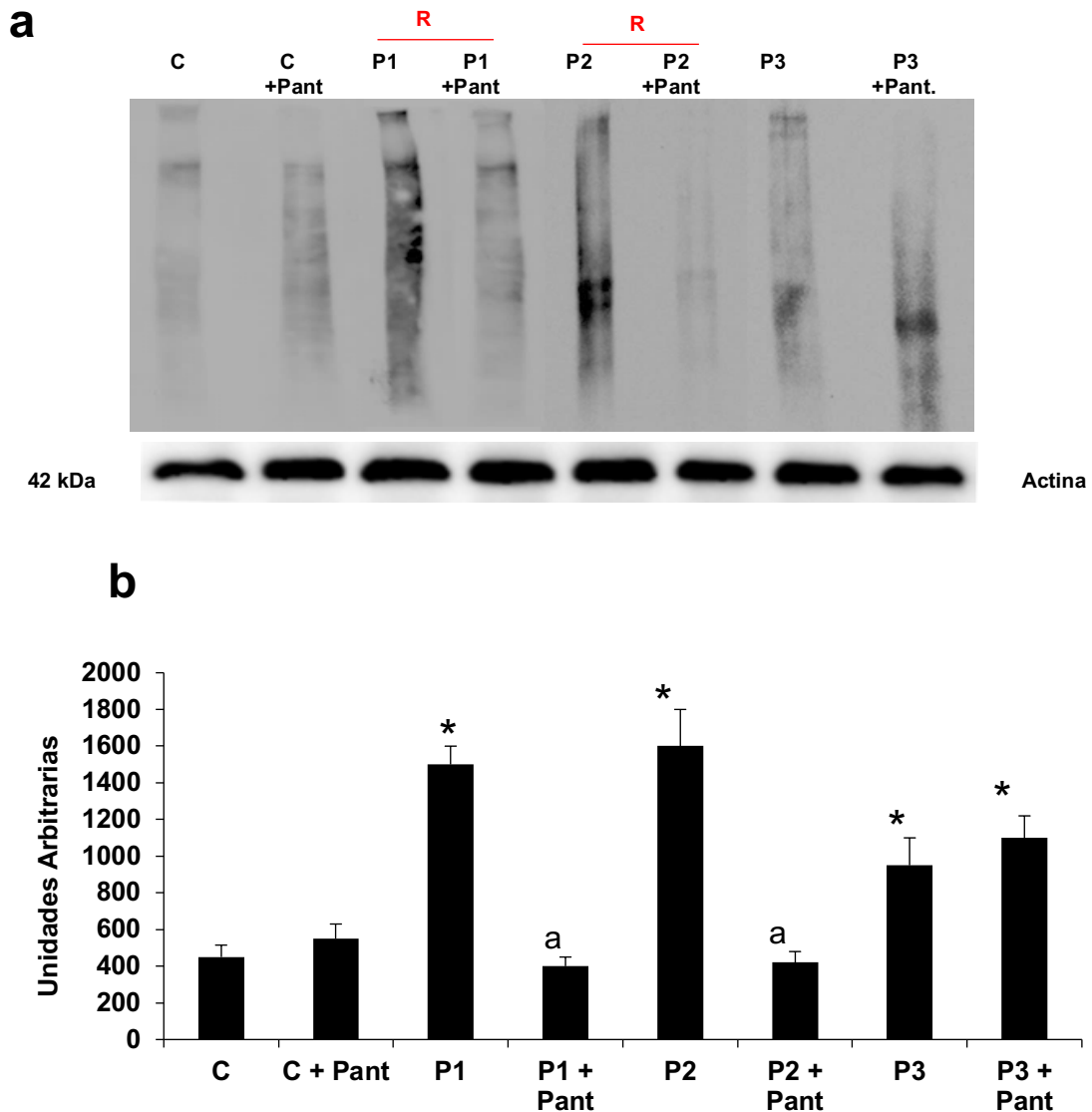


Figura R4a. Evaluación del estrés oxidativo en fibroblastos control y PKAN. Niveles de proteína carbonilada en extractos celulares control (C) y fibroblastos PKAN (P1, P2, P3) fueron analizados por el kit de detección de oxidación de proteínas OxyBlot. R4b. La cuantificación de OxyBlot se realizó utilizando el software ImageJ. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados.

Los niveles de peroxidación lipídica mitocondrial en fibroblastos tratados con pantotenato y no tratados se analizaron por el ensayo de MitoPeDPP, que se oxida específicamente por peróxidos lipófilos en las mitocondrias (221). Los fibroblastos PKAN mostraron un aumento de los niveles de peroxidación lipídica mitocondrial en comparación con las células de control y el tratamiento con

pantotenato fue capaz de reducirlos en los fibroblastos P1 (Figuras R4c y R4d). Los ensayos de microscopía de imagen mostraron que la señal MitoPeDPP colocaliza con marcadores mitocondriales (Figuras R4e y R4f).

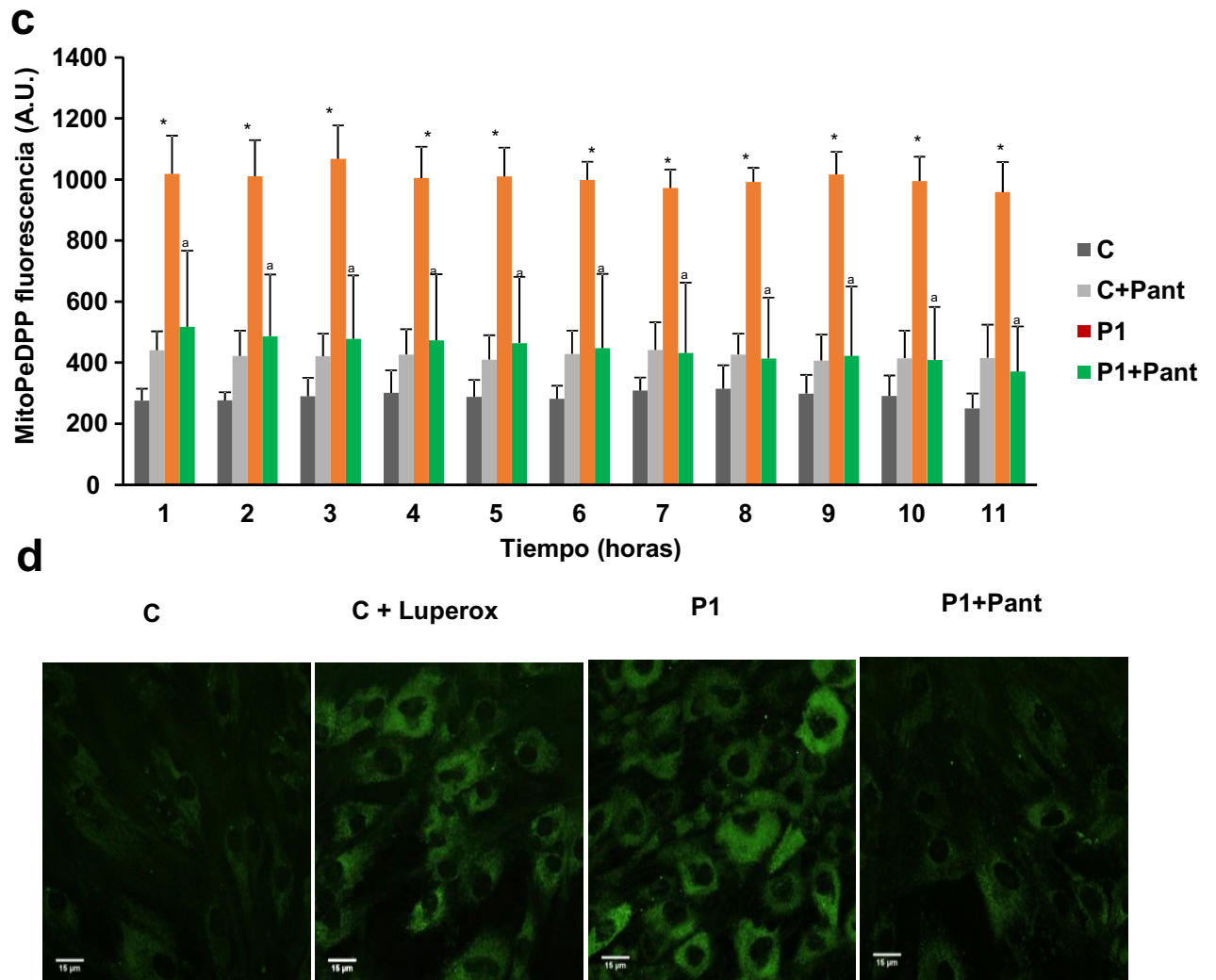


Figura R4c. La peroxidación lipídica mitocondrial se analizó por MitoPeDPP en fibroblastos control (C) y fibroblastos PKAN paciente 1 (P1) no tratados y tratados con pantotenato durante 20 días. R4d. Imágenes representativas de fluorescencia de células control (C) y fibroblastos P1 (MitoPeDPP) sin tratar y tratados con pantotenato durante 20 días. Los fibroblastos control se trataron con Luperrox 500μM (hidroperóxido de terc-butilo) durante 1 h como control positivo de la peroxidación lipídica. Barra de escala = 15 μm. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos separados. AU, unidades arbitrarias

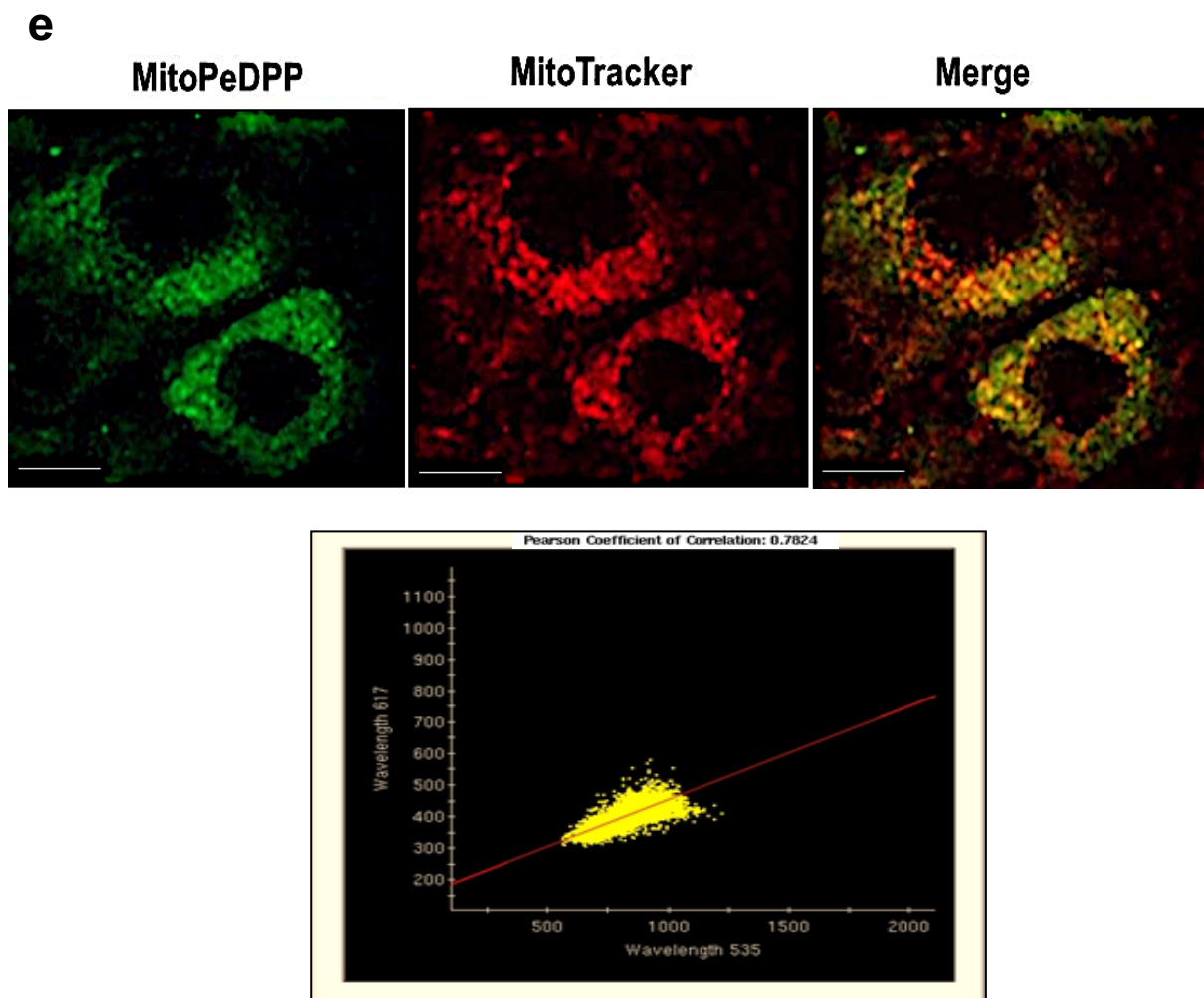


Figura R4e. MitoPeDPP la señal es localizado en la mitocondria. Imágenes representativas de fluorescencia de fibroblastos P1 incubados con MitoPeDPP. Las células se incubaron conjuntamente con MitoTracker para demostrar que la señal MitoPeDPP se colocaliza en la mitocondria. Barra de escala = 15 μm . La colocalización de ambos marcadores MitoPeDPP y MitoTracker se evaluó mediante el software DeltaVision calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

R.5. El tratamiento con pantotenato restaura la bioenergética celular y las alteraciones de la red mitocondrial en los fibroblastos PKAN respondedores

Dado que PANK2 es una enzima mitocondrial, investigamos más a fondo la capacidad del tratamiento con pantotenato para restaurar la bioenergética mitocondrial en células PKAN respondedoras. Para ello, se examinó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células control, células control tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M, células derivadas del P1 y células derivadas del P1 tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M. Se realizó un estudio de la respiración basal, respiración máxima, capacidad respiratoria disponible y producción de ATP. (Figura R5).

Respiración Basal: Se refiere a la capacidad de respiración mitocondrial en las células cuando están en reposo. Se calcula como el valor de la última medición antes de la inyección de oligomicina menos la respiración no mitocondrial.

Respiración máxima: Se refiere a la medición de la respiración mitocondrial y glucólisis de las células cuando están estresadas. Este es calculado como el valor medio de la medición máxima después de la inyección de FCCP menos la tasa de respiración no mitocondrial.

Capacidad de respiración disponible: Es la medición de la capacidad que tienen las células al responder ante una demanda energética. Es un indicador de aptitud o flexibilidad celular. Se calcula como el valor de la respiración máxima menos la respiración basal.

Producción de ATP: Se calcula como el valor de la última medición antes de la inyección de oligomicina menos el ratio mínimo después de la inyección de oligomicina.

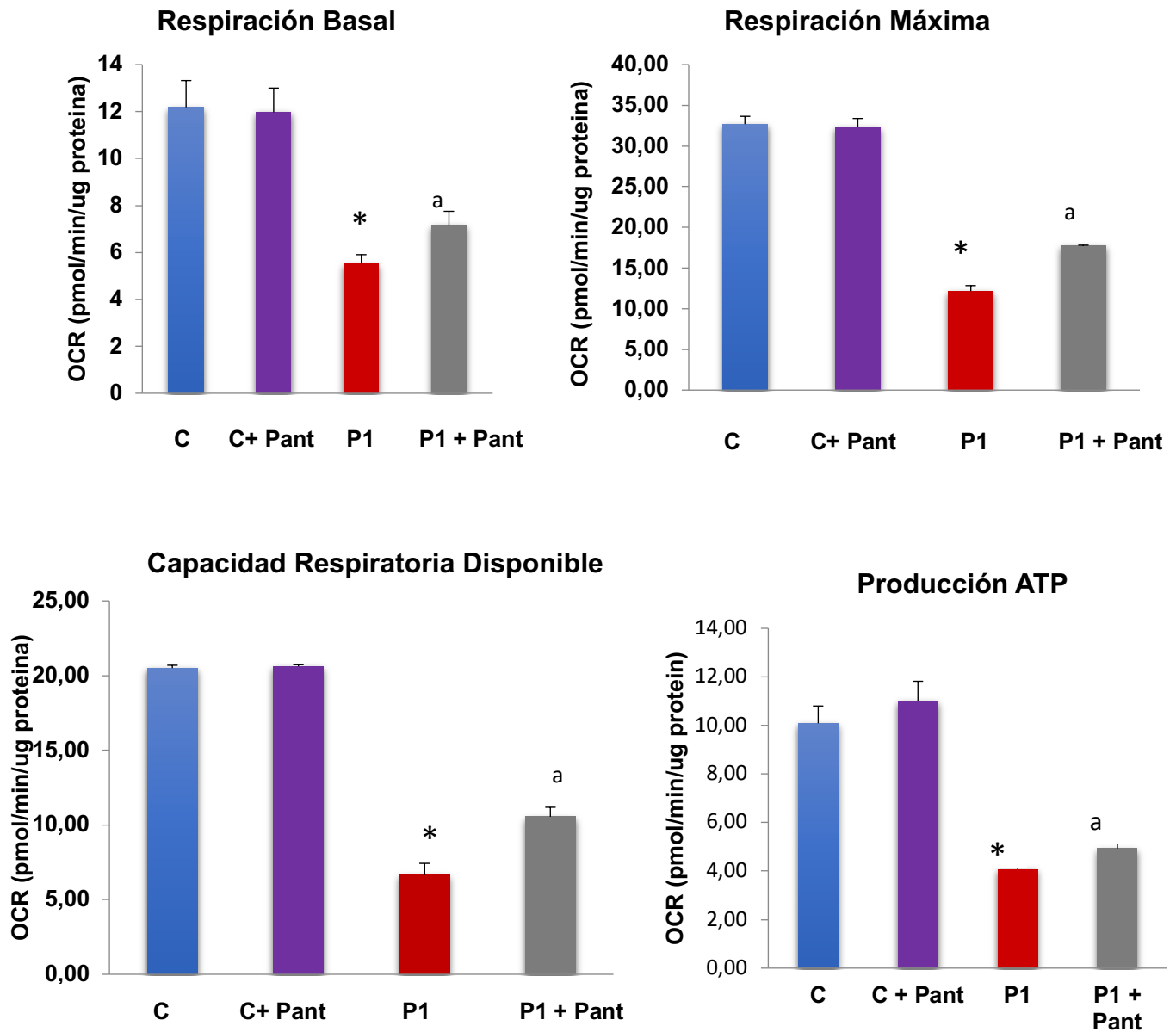
a

Figura R5a. Análisis bioenergético de los fibroblastos control y PKAN. Representación gráfica de la respiración basal, respiración máxima, capacidad respiratoria de reserva y producción de ATP en fibroblastos control (C) y PKAN (P1) utilizando el analizador Seahorse. Las células de control y PKAN se trataron con pantotenato durante 20 días. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.05$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados.

Los fibroblastos del paciente P1 mostraron una reducción de la respiración basal, máxima y de reserva en comparación con las células de control. Además, el OCR acoplado a la producción de ATP también se redujo en los fibroblastos de los pacientes. Esta capacidad respiratoria reducida está de acuerdo con la presencia de disfunción mitocondrial. El tratamiento con pantotenato aumentó significativamente todos los parámetros bioenergéticos alterados en los fibroblastos P1.

Se analizó la morfología mitocondrial en mitocondrias marcadas con anticuerpo anti-citocromo c y se examinó mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes representativas de la morfología mitocondrial se muestran en las Figuras R5b y R5c. La cantidad de fragmentación mitocondrial se evaluó utilizando el software IFDOTMETER. La red mitocondrial en pacientes PKAN estaba más fragmentada que en las células control, lo que indica un perfil bioenergético deteriorado. El tratamiento con pantotenato igualmente restauró la red mitocondrial en las células mutantes.

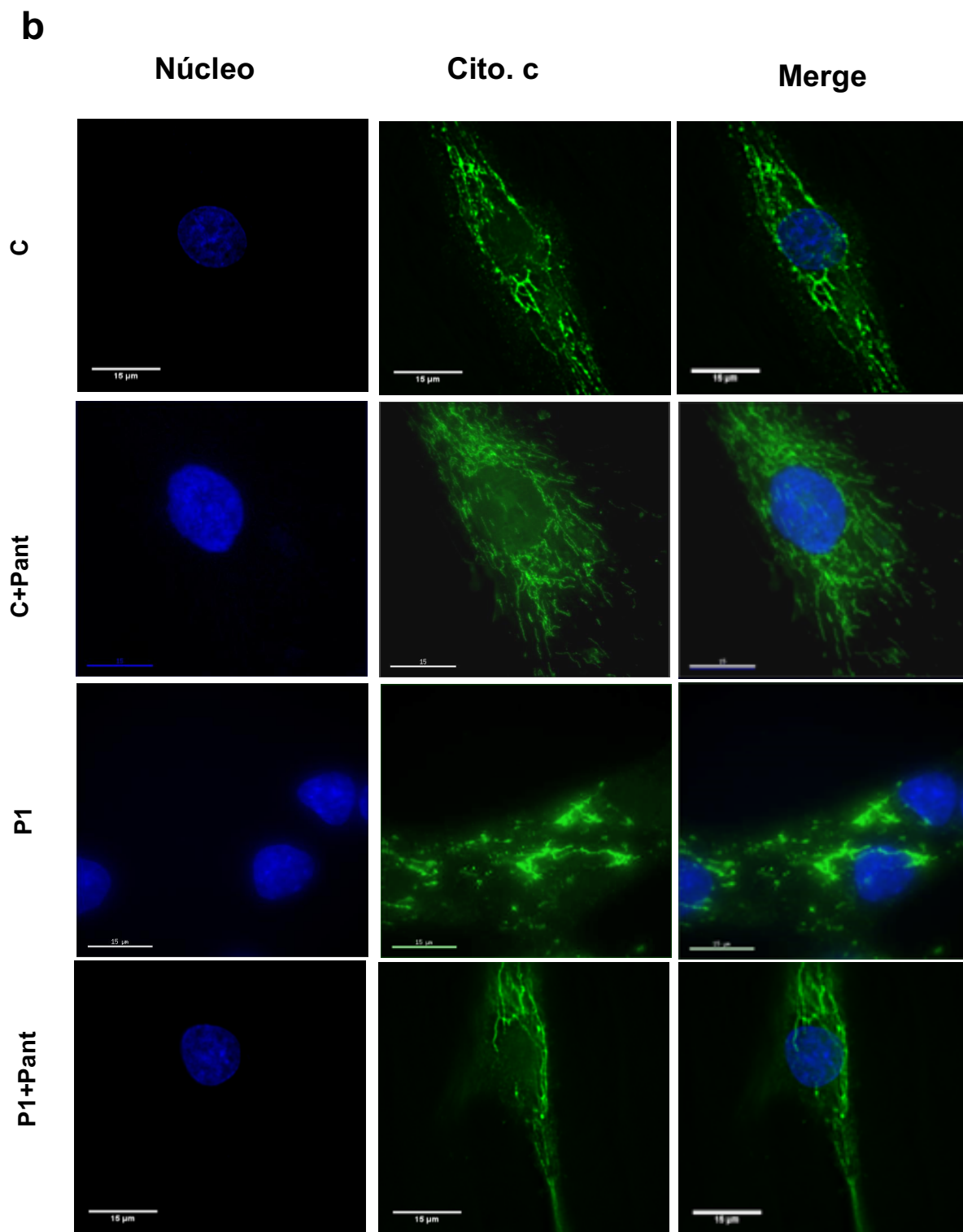


Figura R5b. Fragmentación de las mitocondrias. Imágenes de inmunofluorescencia de fibroblastos control (C) y PKAN (P1) sin tratar y tratados con pantotenato durante 20 días. Las células son inmunoteñidas contra el citocromo c, marcador mitocondrial. Los núcleos se tiñen con Hoechst. Barra de escala = 15 μ m.

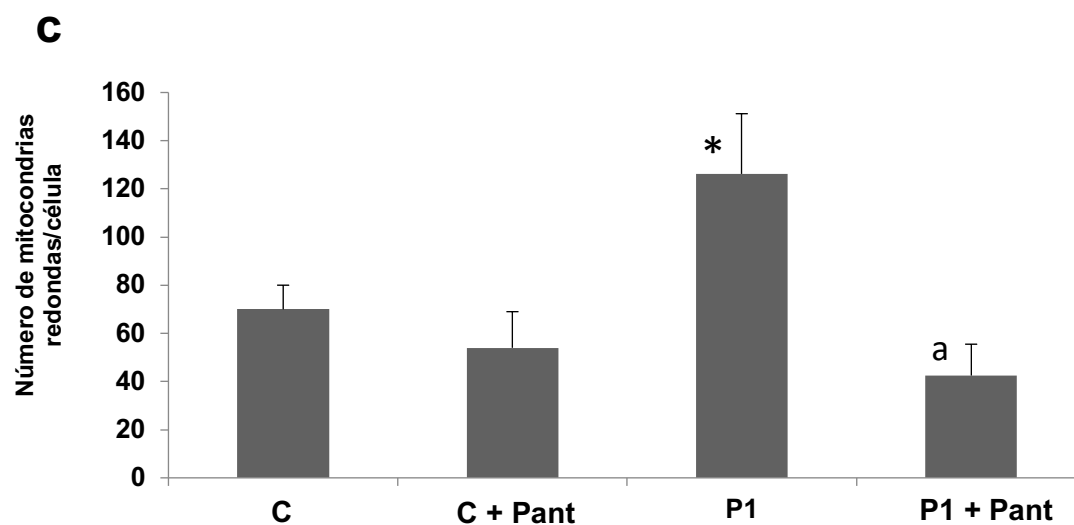


Figura R5c. Cuantificación de la fragmentación mitocondrial. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados.

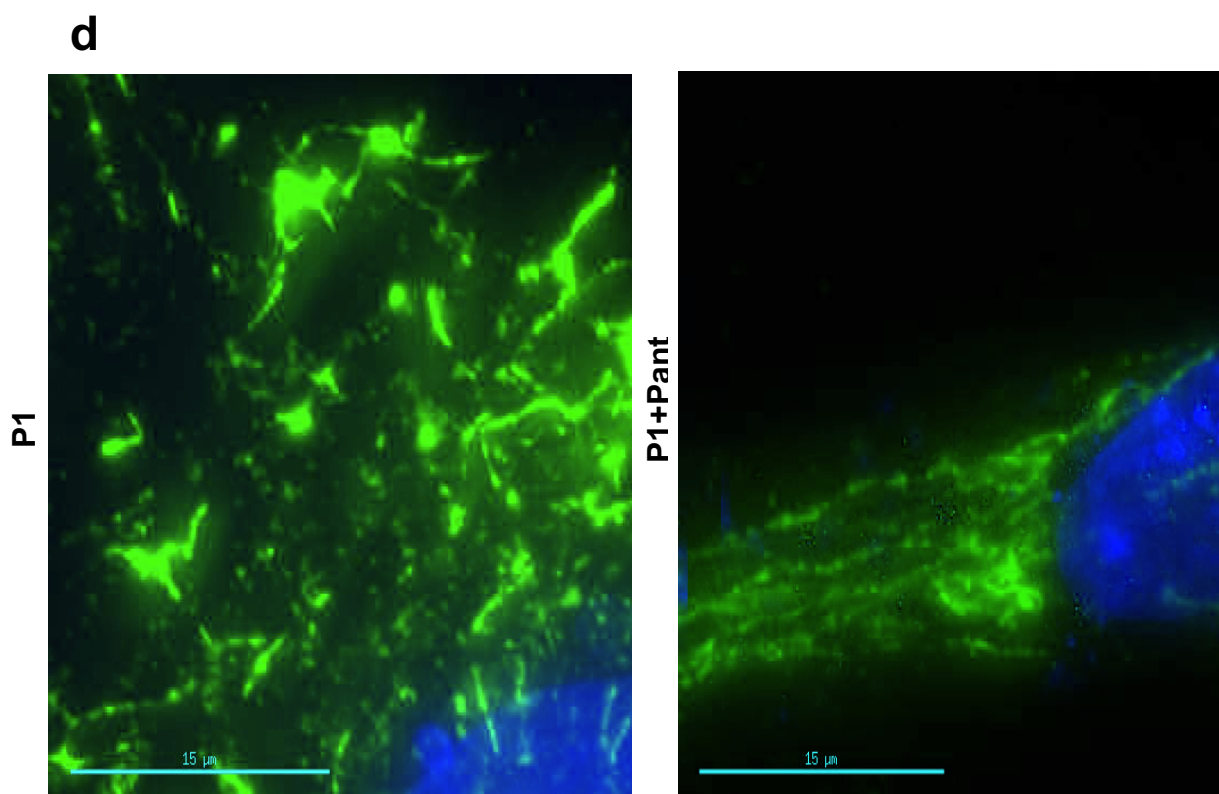
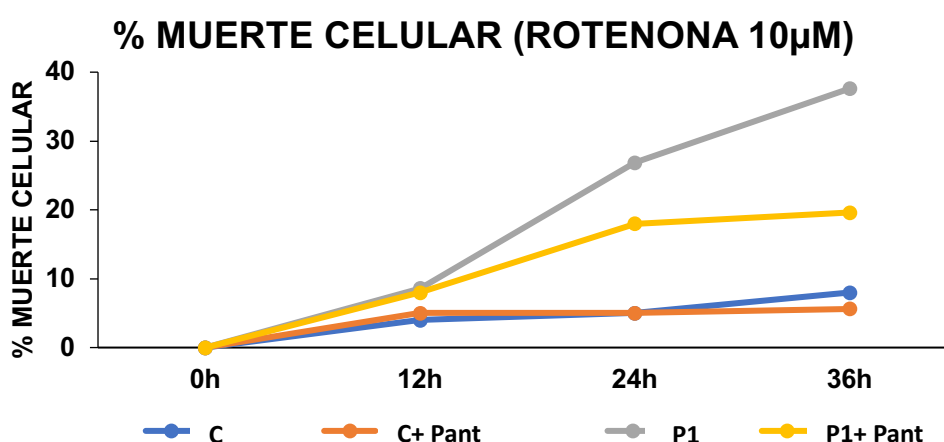


Figura R5d. Fragmentación de las mitocondrias. Ampliación de una imagen de fluorescencia representativa de fibroblastos P1 tratados con pantotenato y no tratados. Barra de escala = 15 µm.

R.6. El tratamiento con pantotenato protege a los fibroblastos respondedores de la muerte inducida

El efecto beneficioso del pantotenato en los fibroblastos PKAN respondedores también se confirmó al examinar el efecto protector del tratamiento en los ensayos de muerte celular inducida por la suplementación con rotenona o hierro. El tratamiento con pantotenato protegió significativamente a las células PKAN de los efectos tóxicos de los suplementos con rotenona y hierro (Figuras R6a, R6b).

a



b

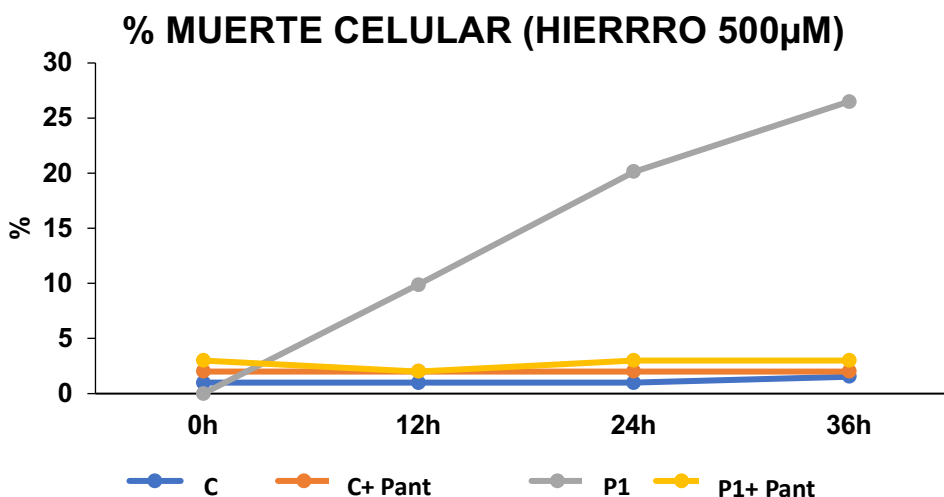


Figura R6. Representación grafica de la muerte celular inducida. Los fibroblastos control y PKAN se trataron con pantotenato durante 20 días. Posteriormente, se añadió 10 μ M de rotenona (a) o 500 μ M de cloruro de hierro (b) al medio de células no tratadas y tratadas. La muerte celular se evaluó a las 12, 24 y 48 horas.

R.7. El tratamiento con pantotenato estabiliza los niveles de expresión proteica de los fibroblastos PKAN

Dado que el pantotenato es el sustrato de la enzima PANK2, se examinó si el tratamiento con pantotenato era capaz de estabilizar la enzima mutante en pacientes seleccionados. El tratamiento con pantotenato estabilizó los niveles de expresión PANK2 en los fibroblastos PKAN respondedores, P1 y P2, pero no en los fibroblastos P3 (Figura R7a).

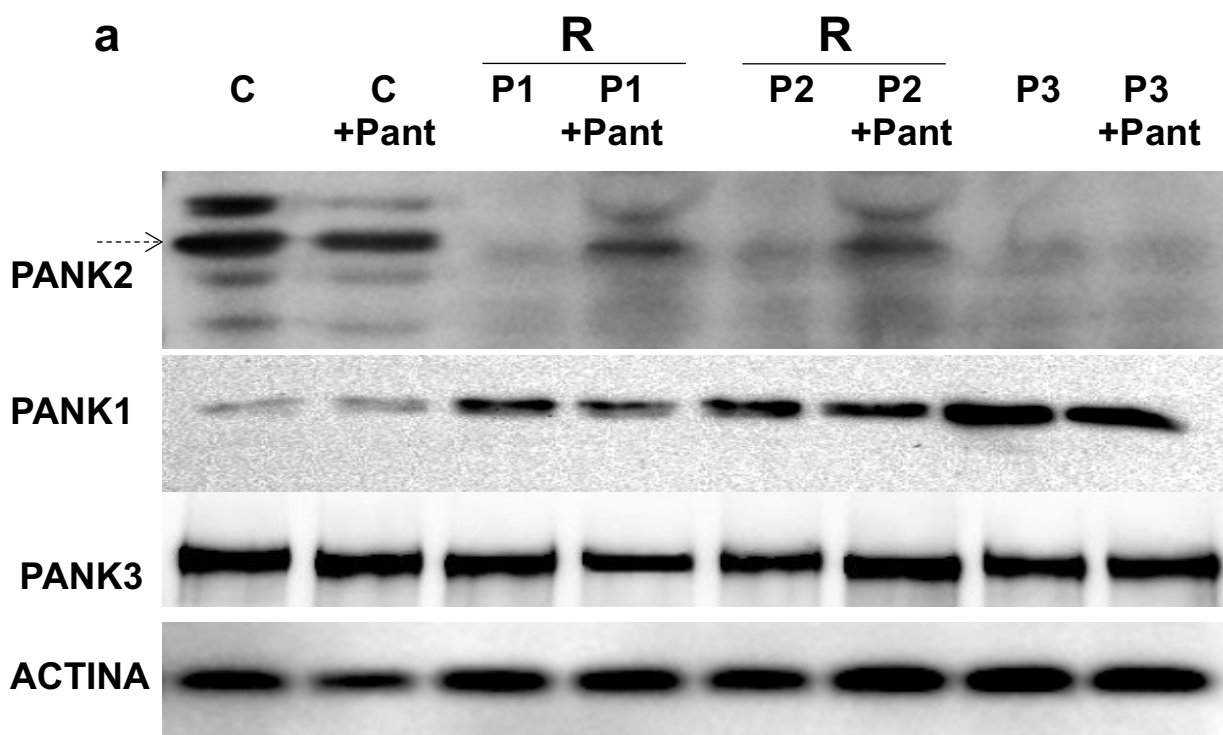


Figura R7a. Estabilización de la enzima PANK2. Análisis de inmunotransferencia de extractos celulares de fibroblastos C y pacientes (P1, P2 y P3). Las células control y los fibroblastos de pacientes fueron tratados con pantotenato durante 20 días. La flecha punteada apunta al péptido maduro PANK2 de 48,5 kDa. Actina se utilizó como control de carga.

Posteriormente, se analizaron los niveles de CoA mediante HPLC, realizando un fraccionamiento celular en fibroblastos control y pacientes, tratados con pantotenato y sin tratar. El CoA analizado en la fracción mitocondrial reveló que el tratamiento con pantotenat aumentó los niveles de CoA en las mitocondrias de los fibroblastos P1, que pueden contener proteína PANK2 residual, pero no

en los fibroblastos P3 que presentan una versión truncada de la enzima (Figura R7b).

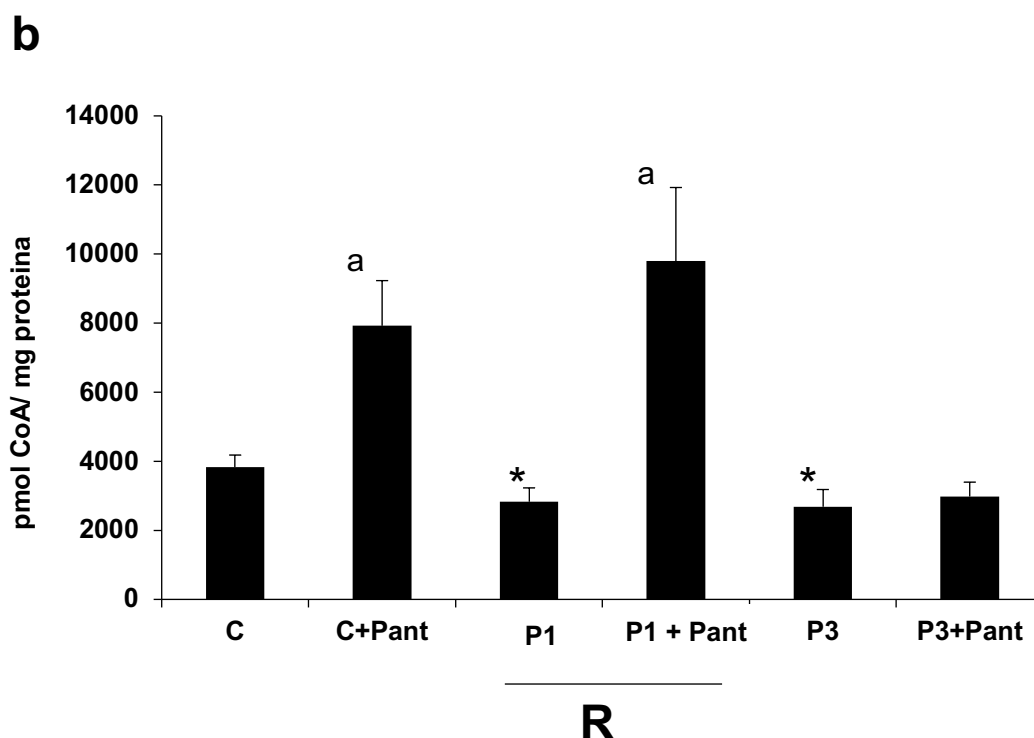


Figura R7b. Niveles de CoA mitocondrial de células control y pacientes P1 y P3 no tratados y tratados con pantotenato. Para las células control, los datos son la media \pm DE para los experimentos realizados en tres líneas celulares de control diferentes. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos separados. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre fibroblastos no tratados y fibroblastos tratados.

R.8. El tratamiento con pantotenato corrige el metabolismo del hierro en los fibroblastos PKAN respondedores

La alteración del metabolismo y la distribución del hierro se ha descrito previamente en los fibroblastos PKAN (220). Para evaluar el efecto del tratamiento con pantotenato en los fibroblastos mutantes, se analizó el metabolismo del hierro mediante el examen de los niveles de expresión de proteínas clave involucradas en el tráfico, almacenamiento y regulación del hierro, tales como DMT1, ferritina, TfR1 e IRP-1. Los niveles de LIP también se cuantificaron mediante el ensayo de calceína. Los fibroblastos mutantes PANK2 mostraron niveles de expresión aumentados de DMT1 con respecto a las células control y su restablecimiento a niveles de fibroblastos control tras el tratamiento

con pantotenato (Figura R8a). Sin embargo, la ferritina, TfR1, y la expresión de IRP-1 los niveles estaban cerca de los valores de fibroblastos control.

a

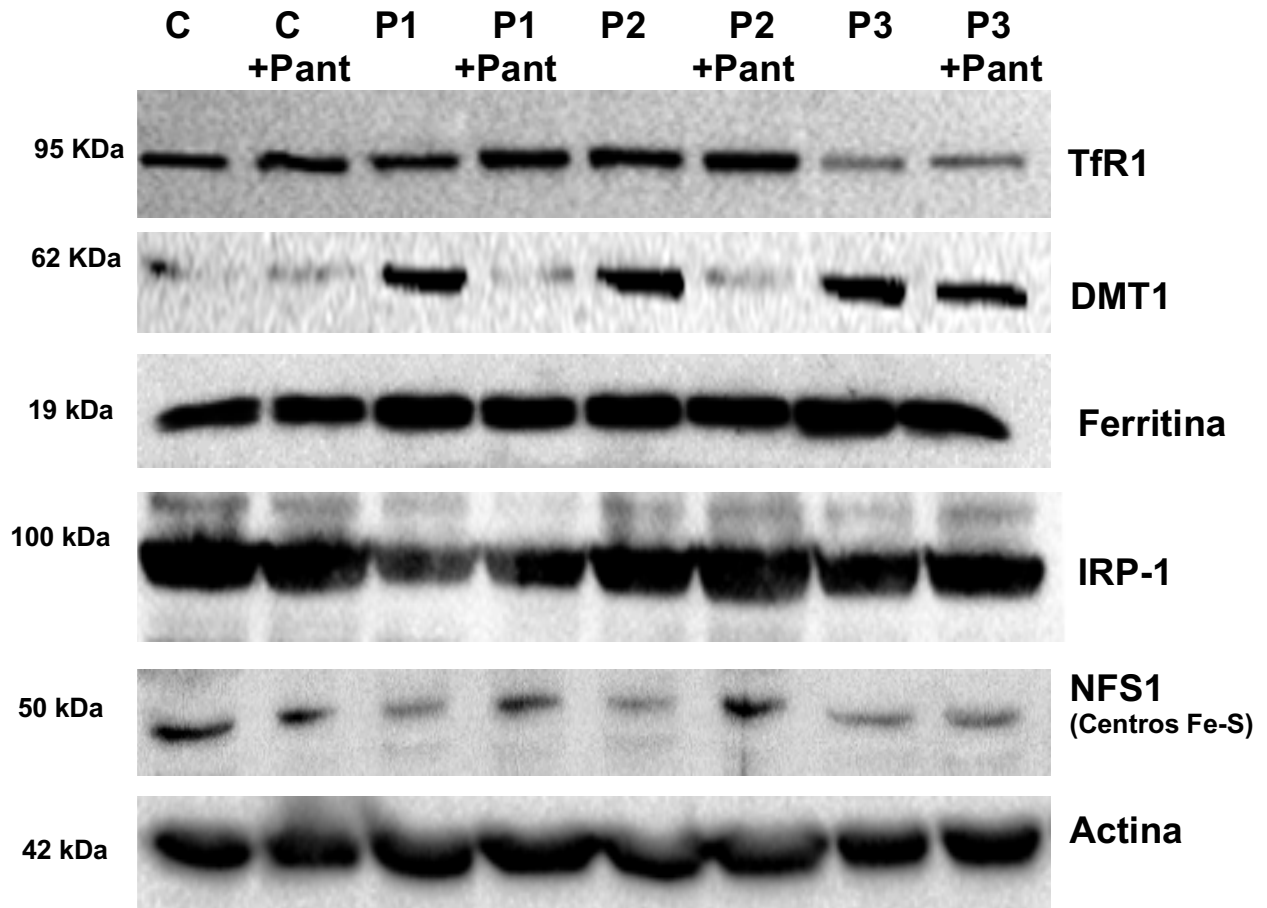


Figura R8a. Metabolismo del hierro. Análisis de inmunotransferencia de extractos celulares de fibroblastos control y pacientes (P1, P2 y P3). Las células control y los fibroblastos P1, P2 y P3 fueron tratados con pantotenato (Pant) durante 20 días. Los datos son un grupo de tres réplicas biológicas. Las membranas se inmunotizaron con anticuerpos contra DMT1, TfR1, ferritina, IRE-1 y NFS1.

El LIP se encontró reducido en las células mutantes, lo que indica paradójicamente la baja disponibilidad de hierro libre por parte de las células PKAN. Tras el tratamiento con pantotenato los niveles de LIP aumentaron en los fibroblastos respondedores (P1 y P2) no teniendo el mismo efecto en el paciente P3. (Figura R8b).

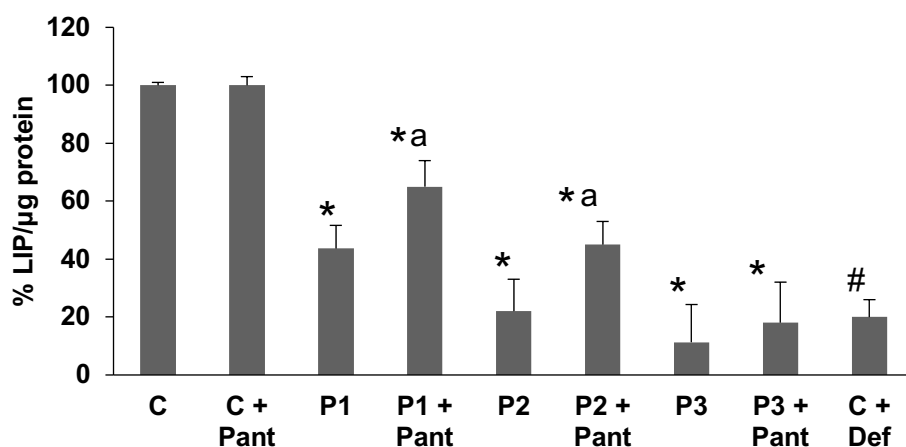
b

Figura R8b. Determinación del LIP en fibroblastos control y fibroblastos PKAN no tratados y tratados (P1, P2 y P3). Las células control tratadas con deferiprona 100 μ M (Def) durante 96 horas se usaron como control negativo. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas con pantotenato (Pant). # $p < 0.01$ entre fibroblastos control no tratados y fibroblastos control tratados con deferiprona (Def).

La alteración que presentan los fibroblastos PKAN en el metabolismo del hierro, se asocia con el deterioro de los centros Fe-S y la biosíntesis del grupo hemo (213). A continuación se determinaron los niveles de expresión de NSF1, una proteína requerida para el ensamblaje de los centros hierro-azufre, y la medición del grupo hemo en fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Los niveles de expresión de NSF1 se redujeron drásticamente en los fibroblastos PKAN, lo que sugiere una desorganización de los centros Fe-S (Figura R8a).

De manera similar, los niveles de grupo hemo están reducidos significativamente en las células mutantes PANK2. Los niveles de NSF1 y grupo hemo se restauraron parcialmente después del tratamiento con pantotenato en los fibroblastos respondedores (Figuras R8a y R8c)

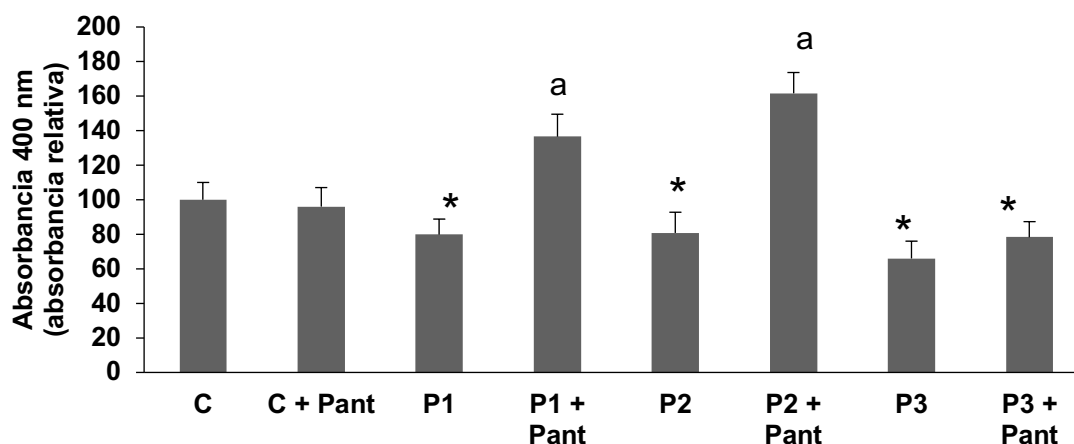
C

Figura R8c. Contenido del grupo hemo en fibroblastos control sin tratar y tratados con pantotenato y fibroblastos PKAN sin tratar y tratados (P1, P2 y P3). Para las células control, los datos son la media \pm DE de tres líneas de células control. * $p < 0.01$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. ^a $p < 0.01$ entre células no tratadas y células tratadas con pantotenato (Pant).

R.9. Caracterización de las neuronas inducidas por reprogramación directa a partir de los fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Evaluación de compuestos positivos en las células neuronales, y estudio de la acumulación de hierro en neuronas control y neuronas PKAN.

Para demostrar el efecto beneficioso del pantotenato en las células respondedoras, los fibroblastos control y del paciente respondedor P1, se transdiferenciaron a neuronas inducidas mediante reprogramación directa. Para ello, se empleó un método descrito (213) para expresar los genes proneurales *Ascl1* y *Blc2* y bloquear el complejo REST, mediante la infección de vectores lentivirales en los fibroblastos control y mutantes PANK2. Veintisiete días después de la infección, las células exhibieron una morfología similar a una neurona y mostraron una inmunorreactividad positiva contra Tau, una proteína asociada a los microtúbulos que se encuentra predominantemente en los axones neuronales del cerebro de los vertebrados, y la proteína asociada a los

microtúbulos 2 (MAP2), una proteína específica de las neuronas que estabiliza los microtúbulos (Figura R9a)

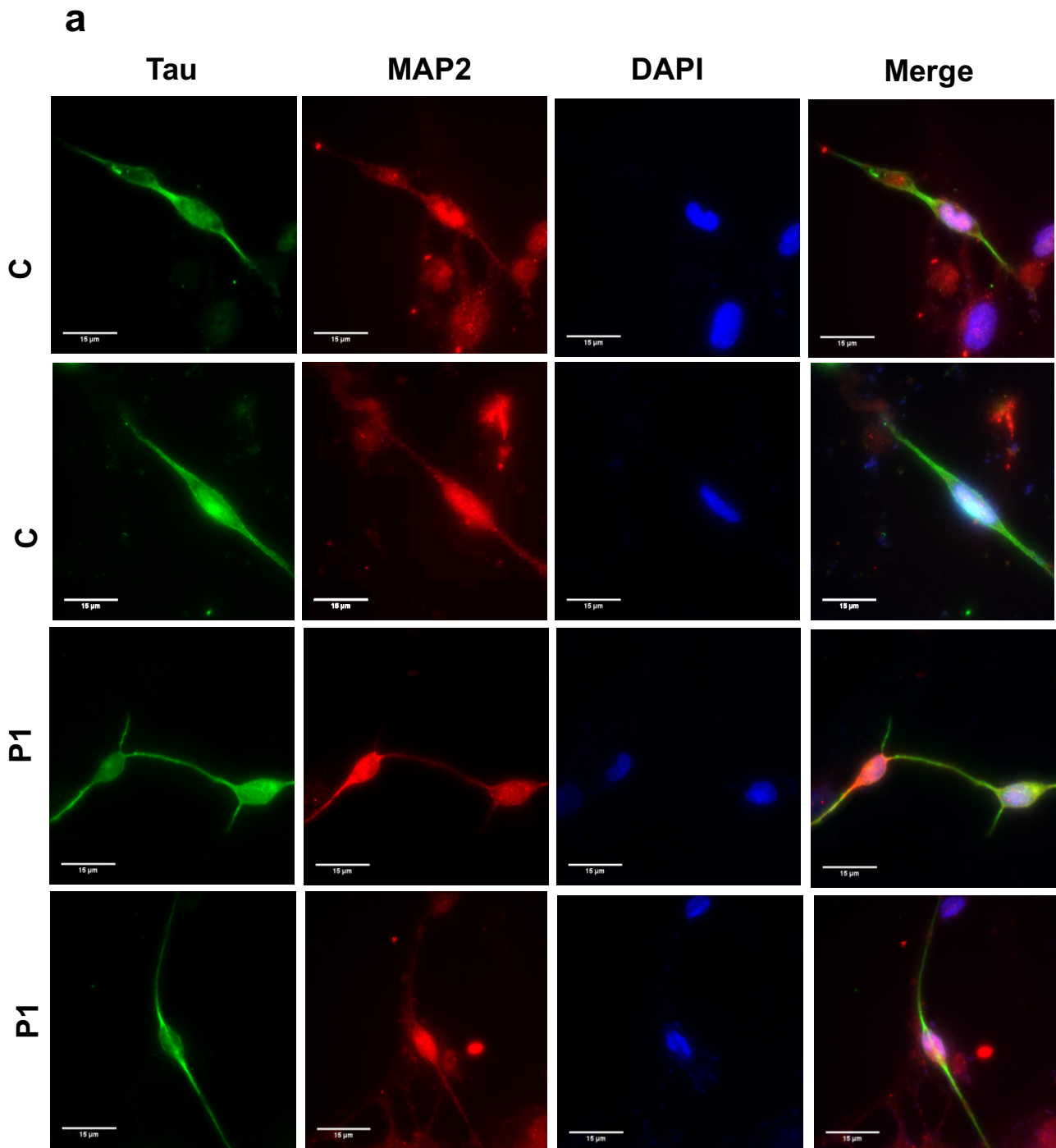


Figura R9a. Generación de neuronas inducidas a partir de fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Microscopía de inmunofluorescencia de neuronas inducidas en control y P1. Las neuronas inducidas fueron inmunotintadas para dos marcadores neuronales, Tau y MAP2. Se usó DAPI para teñir los núcleos celulares (en azul). Barra de escala = 15 μ m.

Las células no diferenciadas, no mostraron la tinción de Tau o MAP2 y solo mostraron la tinción nuclear. Se utilizó células Tau + / MAP2 + para evaluar la eficiencia de conversión neuronal, que fue de casi el 40% en las células control y el 22% en las células PKAN (Figura R9b). La pureza neuronal fue aproximadamente de casi el 37% en las células de control y el 58% en las células PKAN (Figura R9b).

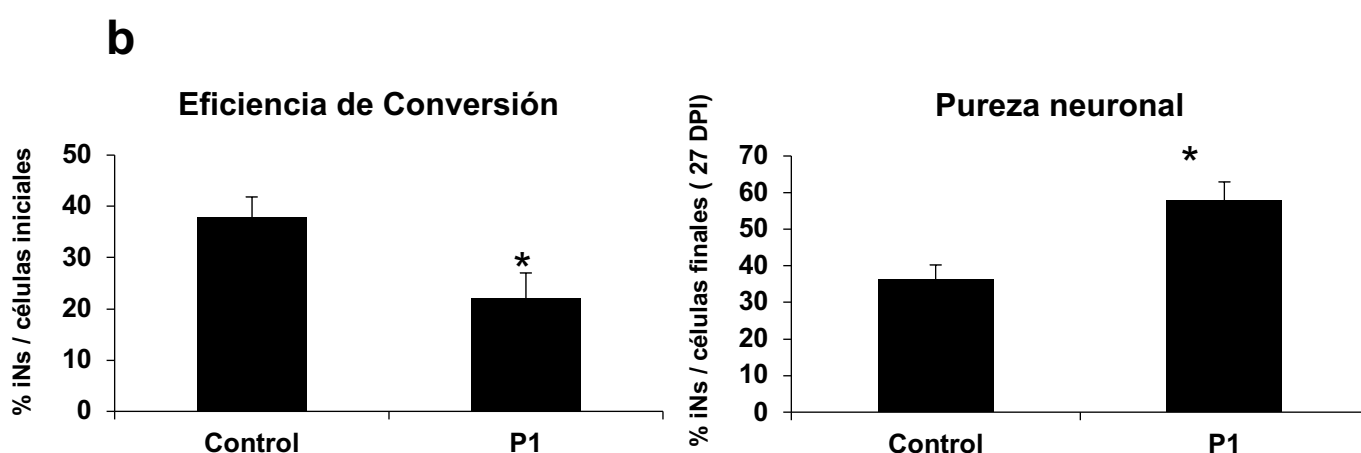


Figura R9b. La inmunotinción Tau / MAP2 se usó para calcular la eficiencia de conversión y la pureza neuronal, y los resultados se representan gráficamente. Los datos que muestran en los gráficos son la media \pm DE de tres experimentos independientes (se examinan al menos 50 neuronas para cada condición y experimento), * $p < 0.05$ entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Para evaluar el efecto beneficioso del tratamiento con pantotenato en neuronas inducidas en fibroblastos PKAN, las neuronas fueron tratadas durante 10 días y se evaluó la acumulación de hierro mediante la tinción con Azul de Prusia en células neuronales derivadas del paciente P1 cuyos fibroblastos responden positivamente al pantotenato. Las neuronas inducidas en mutantes PANK2, mostraron un aumento de la tinción Azul de Prusia, lo que indica la acumulación de hierro mientras que, los fibroblastos tratados con pantotenato, dicha acumulación de hierro se eliminó (Figuras R9c, R9d, R9e).

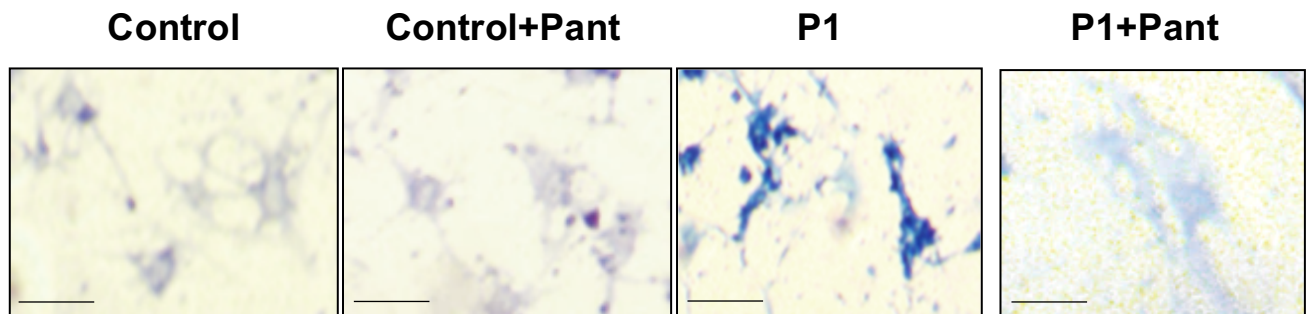
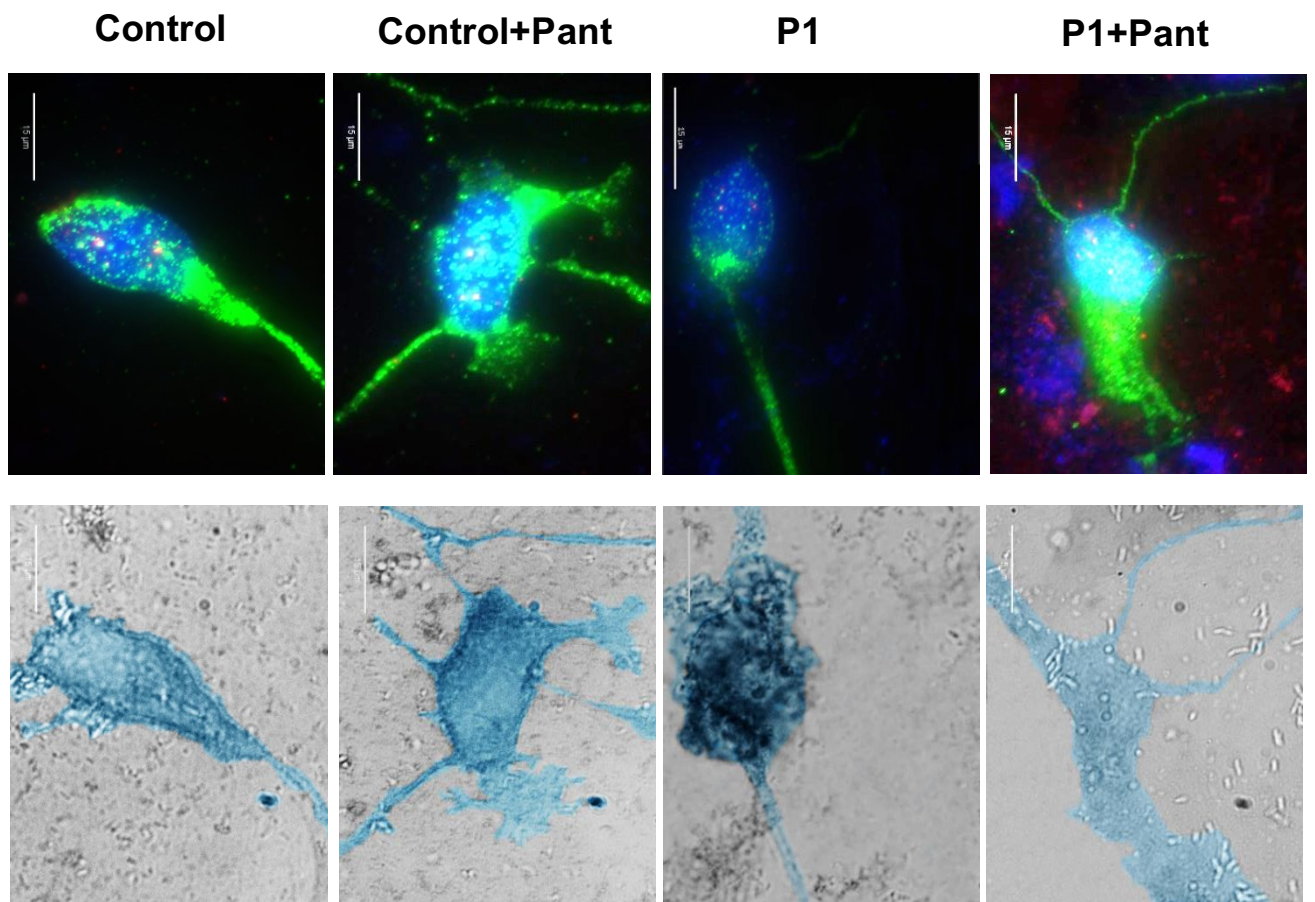
c**d**

Figura R9c. Las neuronas inducidas mutantes PANK2 mostraron acumulación de hierro. Imágenes de campo claro de la tinción con Azul de Prusia de neuronas control y neuronas P1 sin tratar y tratadas con pantotenato durante 10 días. Barra de escala = 50 μ m. **R9d.** Imágenes de fluorescencia a gran aumento de neuronas control y neuronas inducidas P1 inmunotratadas con Tau, marcador neuronal (los núcleos se revelaron por tinción de Hoechst). Las imágenes de campo claro corresponden tras la tinción con Azul de Prusia. Barra de escala = 15 μ m.

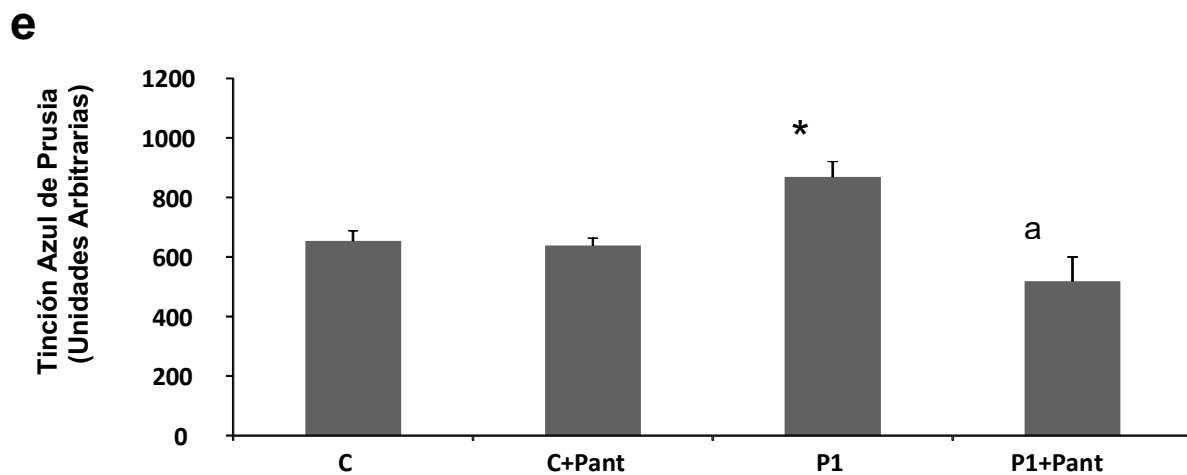


Figura R9e. Cuantificación de la tinción con Azul de Prusia. Los datos representan la media \pm DE de tres experimentos separados (se examinan al menos 50 neuronas para cada condición y experimento). * $p < 0.01$ entre neuronas control y neuronas inducidas PKAN. ^a $p < 0.01$ entre neuronas inducidas no tratadas y neuronas inducidas tratadas. A.U., unidades arbitrarias

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NACH) abarca un grupo de trastornos neurodegenerativos poco frecuentes, caracterizados clínicamente por la presencia de distonía, rigidez, coreoatetosis, degeneración retiniana o atrofia óptica, trastornos neuropsiquiátricos, y muerte precoz. Las características anatomopatológicas incluyen la acumulación de hierro en los ganglios basales y en menor grado en la sustancia negra y áreas adyacentes, y la presencia prominente de dilataciones axonales generalizadas, denominadas cuerpos esferoides en el sistema nervioso central, correspondientes a neuronas dañadas (222, 223). Actualmente, más de quince genes con sus mutaciones asociadas son reconocidas como la causa de las diferentes entidades clínicas de las NACH (224). Sin embargo, cerca del 20% de los pacientes todavía no están identificados genéticamente.

A pesar de los extensos esfuerzos de investigación en el desarrollo de nuevos tratamientos, todavía no hay un tratamiento exitoso para detener la progresión de la neurodegeneración en las NACH. En esta tesis hemos desarrollado nuevas estrategias terapéuticas para las mutaciones en el gen de la pantotenato quinasa 2 (PANK2), que codifica una enzima en la ruta biosintética del CoA, molécula esencial para el metabolismo celular.

Las mutaciones en la PANK2, son la forma más común de NACH, representando casi el 50% de los casos (220). La neurodegeneración asociada a la pantotenato quinasa (PKAN) incluye la forma clásica y la forma atípica. La PKAN clásica se caracteriza por comenzar en la primera etapa de la infancia (antes de los 6 años de edad en el 88% de los casos). Los síntomas más frecuentes son distonía progresiva, rigidez, disartria, coreoatetosis, y degeneración de la retina. La PKAN atípica se caracteriza por su inicio tardío (edad > 10 años), y presenta defectos en el habla, alteraciones psiquiátricas y una progresión más lenta de la enfermedad (223).

En esta tesis, se ha examinado la fisiopatología de tres pacientes con mutaciones en PANK2, usando como modelos de la enfermedad los cultivos de fibroblastos dérmicos derivados de los pacientes con PKAN. En este estudio,

demostramos que los fibroblastos derivados de los pacientes PKAN presentan una típica morfología senescente y pueden reproducir muchas de las alteraciones patológicas que se producen a nivel neuronal. El paciente P1 es doble portador heterocigoto en la posición 747dup (p.Arg249ProfsX43) que causa un codón de stop y en c.1475C>G (p.Ala492Gly) que causa un cambio de sentido; el segundo paciente (P2) es doble heterocigoto en las posiciones 240-241delCA y T217I (650C>T); el tercer paciente (P3) presenta una mutación homocigótica 1259delG, causando un cambio de lectura p.F419fsX472 y la síntesis de una proteína truncada. Se ha descrito ampliamente el uso de estas líneas celulares para examinar los efectos patológicos de este tipo de enfermedades (193,225).

En esta tesis hemos examinado en modelos celulares de la enfermedad la expresión de la PANK2, la acumulación de hierro y lipofuscina, las alteraciones de la morfología celular, así como la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo que manifiestan este tipo de patologías.

La acumulación de hierro en los modelos celulares se confirmó por la tinción de Azul de Prusia, por ensayos bioquímicos y espectrofotometría de masas. En la tinción de Azul de Prusia, el hierro depositado se libera por la acción del ácido clorhídrico y reacciona con ferrocianuro potásico para formar ferrocianuro férrico. Esta técnica pone en evidencia la presencia de complejos insolubles de hierro por la formación de un precipitado coloreado (Azul de Prusia). La intensidad del color es un parámetro cualitativo y su utilidad es evaluar de forma rápida el hierro presente en las muestras. Para confirmar dichos resultados, el hierro también se determinó mediante ensayos bioquímicos como el de la Ferrozina, donde el ión férrico presente en la muestra y unido a la transferrina es liberado por la acción del guanidinio y reducido a ferroso por el ácido ascórbico. El ion ferroso forma un complejo coloreado con la ferrozina que fue cuantificado por espectrofotometría. Las muestras fueron también analizadas por espectrofotometría de masas, que permite detectar la presencia del hierro, así como cuantificar su concentración en cada una de las muestras analizadas. Estos resultados mostraron claramente que el hierro se acumula en los fibroblastos PKAN, siendo un modelo útil para el estudio de la fisiopatología.

También se utilizó como control además de los fibroblastos de sujetos sanos, fibroblastos derivados de pacientes con el Síndrome MERRF, que presentan afectación neurológica, pero no acumulación de hierro. A su vez, la acumulación de lipofuscina se determinó mediante el análisis de autofluorescencia, la tinción de Negro Sudán y microscopía electrónica. También se comprobó la acumulación de hierro en neuronas generadas por la técnica de reprogramación directa desde los fibroblastos mutantes. Nuestros hallazgos indican que las alteraciones patológicas detectadas en los fibroblastos y neuronas inducidas PKAN pueden ser útiles para entender los mecanismos patológicos de la enfermedad, así, como el desarrollo de nuevos protocolos de cribado de medicamentos potencialmente eficaces para este tipo de patologías.

El tratamiento con D-pantotenato sódico a una concentración de 500 μ M restauró todas las alteraciones patológicas, incluyendo los niveles del CoA, en dos de las líneas celulares mutantes P1 y P2, pero no en P3. Esta respuesta diferente podría deberse fundamentalmente a los diferentes tipos de mutación en cada una de las líneas celulares de fibroblastos, aunque también habría que tener en cuenta el fondo genético, edad y sexo del paciente. Los fibroblastos P1 y P2 tienen una expresión residual de la proteína PANK2 que se estabilizó con el tratamiento con pantotenato, mientras que en el paciente P3 la expresión de PANK2 era nula, debido a que la mutación presenta un cambio de lectura y como consecuencia la expresión de una proteína truncada. La eliminación de la acumulación de hierro por el tratamiento con pantotenato también fue demostrada en las neuronas inducidas derivadas de los fibroblastos respondedores

La molécula D-pantotenato sódico es una formulación de la vitamina hidrosoluble ácido pantoténico (vitamina B5). Esta vitamina se suministra principalmente en forma de sal de sodio debido a su mayor estabilidad, transformándose posteriormente, en el ácido pantoténico en el interior del organismo. En el pantotenato sódico, la sal introduce una molécula de ácido pantoténico, ello puede llegar a pensar, que la introducción del ácido pantoténico como sal, aumenta la concentración del mismo intracelular, forzando a la

maquinaria celular a una mayor producción del enzima mutante capaz de metabolizar el aumento de sustrato.

Hay que destacar que el D-pantotenato de sodio es estable al oxígeno atmosférico y a la luz. La vitamina B5 administrada de forma oral se absorbe fácilmente en el tubo digestivo y se distribuye hacia los tejidos corporales. Destaca su acción en el metabolismo de los macronutrientes y forma parte de la molécula de Coenzima A, molécula esencial para el organismo y que está involucrada en una gran cantidad de funciones celulares (226) (Figura D1).

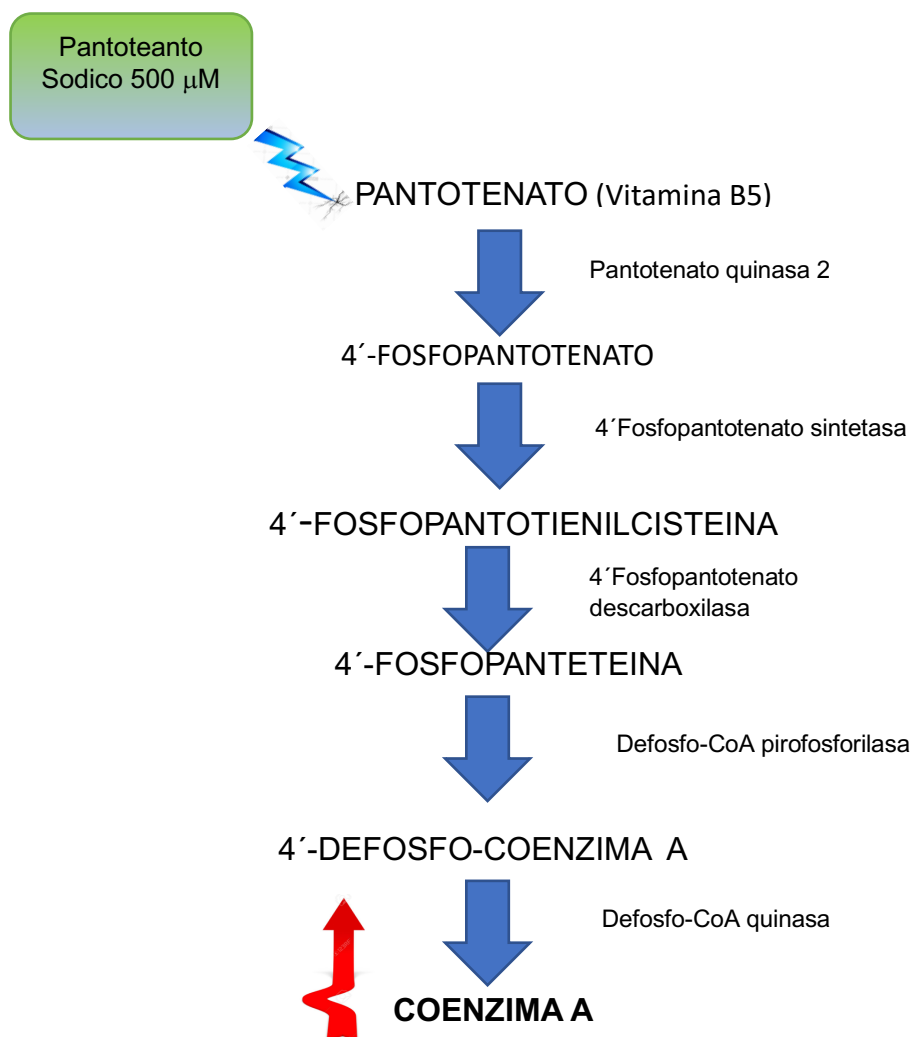


Fig D1: Esquema representativo de la ruta del Coenzima A. El pantotenato sódico es el sustrato de la enzima PANK2. El tratamiento con pantotenato sódico a 500 µM mejora la transcripción, traducción, disponibilidad o actividad de la enzima PANK2, permitiendo un aumento de los niveles de Coenzima A.

Se ha demostrado ampliamente, que la utilización de los fibroblastos dérmicos derivados de los pacientes que presentan este tipo de patologías, es muy útil, ya que manifiestan muchos de las alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad. Recientemente, Ingrassia et. al han demostrado que los fibroblastos derivados de los pacientes afectados con BPAN, otro subtipo de NACH, presentan acumulación de hierro, que puede detectarse mediante protocolos de tinción específicos (279).

En esta tesis demostramos claramente que la acumulación de hierro en los fibroblastos y neuronas inducidas de los pacientes PKAN, ambos modelos celulares pueden ser herramientas útiles para el estudio de la fisiopatología de la PKAN. Trabajos anteriores, han demostrado que las neuronas inducidas por reprogramación directa con mutaciones en PANK2, muestran alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, signos de disfunción mitocondrial y un estado oxidativo alterado (226). En este trabajo demostramos por primera vez la acumulación de hierro en neuronas inducidas mutantes, y que el tratamiento con pantotenato es eficaz en su eliminación.

El hierro es un elemento esencial para la fisiología celular, participando en una amplia variedad de procesos celulares (227). Sin embargo, el hierro puede intervenir en la producción de ROS y su sobrecarga puede promover daño celular por la formación de radicales hidroxilo que conduce a la oxidación de proteínas/lípidos y ácidos nucleicos (228, 229).

Previamente se ha demostrado mediante la tinción de Azul de Prusia en tejido cerebral de pacientes afectados por PKAN, que el hierro se acumula en los ganglios basales (230). La acumulación de hierro también se produce en menor medida en la sustancia negra y otras áreas del cerebro. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la acumulación de hierro. Una posible hipótesis es que la acumulación de hierro intracelular resulta de la apoptosis neuronal mediada por ceramida, que depende de una mayor captación de hierro celular (231). Una hipótesis alternativa apoyada por los resultados obtenidos en esta tesis, es que la acumulación de hierro puede deberse a la acumulación de gránulos de lipofusina que tienen un alto contenido en hierro, un 5% en los fibroblastos de los pacientes PKAN, mientras que en condiciones normales es un 2%. La

lipofuscina es un agregado de proteínas y lípidos altamente oxidados . Está compuesta además por metales como el Fe, Cu, Zn, Al, Mn y Ca.

La lipofuscina es insoluble y no se degrada por las enzimas lisosomales ni por el sistema proteosomal, responsable de la degradación de proteínas mal plegadas y oxidadas. Este tipo de moléculas se ha descrito en muchos tipos celulares como los cardiomiocitos, los hepatocitos y las neuronas. Algunos autores sugieren que las mitocondrias están involucradas en la formación de lipofuscina (232), y se ha demostrado que las mitocondrias aisladas pueden sufrir una transformación a gránulos de lipofuscina sin ningún factor adicional (233). La acumulación de lipofuscina es considerada como uno de los biomarcadores de envejecimiento celular (234), y en esta tesis se demuestra que su acumulación está asociada con la presencia de un fenotipo senescente típico en las células PKAN. La formación de gránulos está asociado a la senescencia celular inducida por el estrés provocado por la deficiencia en la actividad del proteosoma (235). Además, varios estudios han propuesto que la lipofuscina es capaz de inhibir el proteosoma (236). La actividad del proteosoma se inhibe debido a su unión a estructuras de los aminoácidos expuestos en la superficie de la lipofuscina (237, 238). No obstante, el proteosoma unido a la lipofuscina es ineficaz para eliminar las proteínas oxidadas. En consecuencia, el secuestro del proteosoma por la lipofuscina reduce la degradación y recambio de otras proteínas celulares. Además, se ha descrito que la lipofuscina disminuye la función lisosomal necesaria para los procesos de autofagia (237). La combinación de ambos procesos, la deficiencia en la actividad del proteosoma así como la inhibición de la función lisosomal, se han propuesto como mecanismos facilitadores de la formación de lipofuscina.

Además un factor principal de citotoxicidad de la lipofuscina es su capacidad para incorporar metales de transición como el hierro (239). Por otra parte el hierro es un metal de transición muy abundante en las células de los mamíferos y su unión a la lipofuscina da como resultado una superficie con actividad redox capaz de catalizar la reacción de Fenton.

Dicha reacción, provoca que la lipofuscina forme radicales libres que oxidan los componentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y finalmente

a la muerte celular (240). Este estado oxidativo ha sido estudiado previamente en fibroblastos (205), y confirmado en células de pacientes con mutación PANK2, donde se apreció un aumento del estrés oxidativo asociado a un aumento de las proteínas carboniladas y una alta peroxidación lipídica mitocondrial (241, 242).

Las anomalías citosolicas en las células de pacientes con NACH ya han sido examinadas previamente. Así se han descrito la presencia de macrófagos en la médula ósea que contienen lipofuscina cerioide, y linfocitos circulantes con vacuolas y cuerpos de inclusión citoplasmáticos similares a los observados en el almacenamiento de la lipofuscina cerioidea (204). También se ha observado acumulación de lipofuscina en los fibroblastos conjuntivales, los pericitos de los vasos retinianos y los macrófagos (216). La alta peroxidación de las mitocondrias podría venir asociada a un acumulo de hierro en las mismas, que finalmente derivaría en los gránulos de lipofuscina y a una excesiva producción de ROS (Figura D2). Cabe mencionar que se ha observado, mediante microscopía electrónica, como el retículo endoplasmático se encuentra distendido en las células mutantes, hecho que conduciría al mal funcionamiento de este orgánulo responsable de la maduración, el plegamiento y la distribución de las proteínas, además es responsable del sistema UPR (unfolded protein response), proceso también ligado a la formación de gránulos de lipofuscina.

Todas estas alteraciones pueden ayudar para entender la fisiopatología de las NACH y de las PKAN en particular.

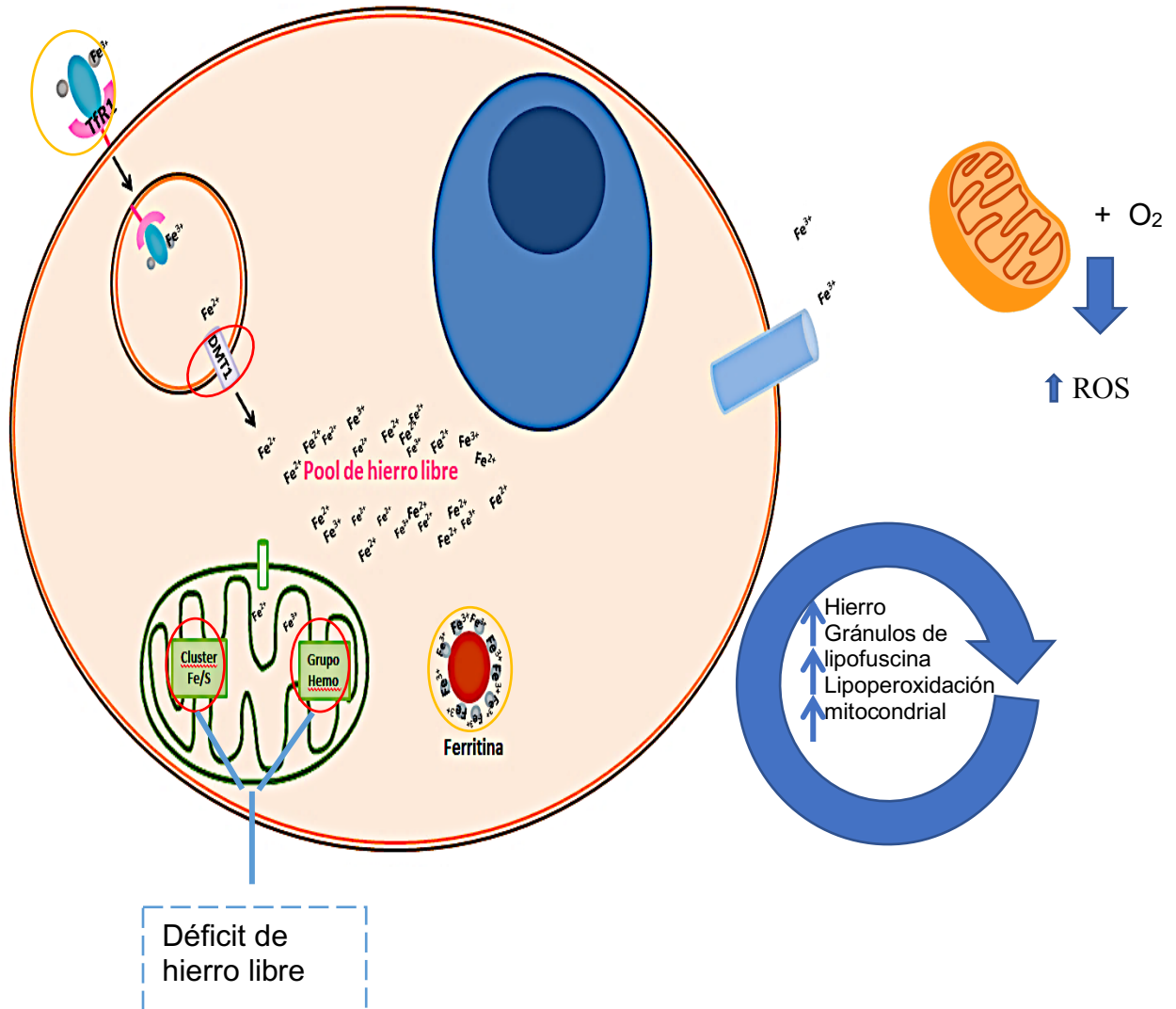


Fig D2: Alteración del metabolismo del hierro en células PKAN. Las células de los pacientes afectados con PKAN presentan una mayor acumulación de hierro, acumulación de gránulos de lipofuscina y una mayor lipoperoxidación mitocondrial. Las mitocondrias en presencia de oxígeno, produce una mayor cantidad de ROS, una mayor lipoperoxidación, provocando que el hierro se acumule en forma de lipofuscina debido a la peroxidación de las mitocondrias. El grupo hemo, los centros Fe-S y proteínas como el DMT1, presentan diferencias entre fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Esta diferenciación puede ser porque los fibroblastos PKAN a pesar de presentar acumulación de hierro en su interior determinada con la tinción Azul de Prusia, realmente presentan un déficit de hierro libre, siendo incapaz los centros Fe-S y grupo hemo formarse correctamente, ya que realizan sus funciones dentro de compartimentos membranosos de la mitocondria siendo necesario la disponibilidad del hierro.

Los pacientes con PKAN presentan alteraciones del metabolismo del hierro que pueden ser estudiadas en los fibroblastos derivados de los pacientes. Las alteraciones del metabolismo del hierro en los fibroblastos con mutaciones en PANK2 ha sido descrito anteriormente (225) y se ha atribuido al deterioro de la síntesis mitocondrial de los centros Hierro-Azufre (Fe-S) y la biosíntesis del grupo hemo (196). En esta Tesis confirmamos que ambos procesos están realmente alterados en los fibroblastos mutantes PANK2. Así mismo, hemos demostrado que el tratamiento con pantotenato corrigió ambas alteraciones.

Los centros Fe-S son grupos próstéticos de un amplio grupo de proteínas mitocondriales de los complejos respiratorios y citosolicas como las aconitasas (55). La deficiencia de los centro Fe-S afecta muchas vías biosintéticas y conduce a una disfunción mitocondrial. Una consecuencia de esta deficiencia es la utilización ineficiente del hierro que puede conducir a su acumulación en la mitocondria. A su vez, la sobrecarga del hierro puede producir un aumento en la producción de radicales libres provocando un daño celular mayor (244). Además, la ineficaz utilización del hierro mitocondrial puede representar la señal de la mal regulación del hierro en las células y con el tiempo conducir a una acumulación de este en el interior celular (246). Diversos autores han descrito que el silenciamiento de la PANK2 en varias líneas celulares humanas indujo a una reducción en la proliferación celular junto con un aumento de la deficiencia de hierro y un aumento de los niveles de expresión del receptor de la transferrina (TfR1) (246) encargada de la captación de hierro, o ferritina, encargada de su almacenamiento.

Se cree que esta alteración del metabolismo del hierro provoca que la cantidad de aconitasa, enzima dependiente del hierro, se vea reducida tanto en el citosol como en la mitocondria (256). La aconitasa citosólica es una proteína bifuncional que ejerce su función como moduladora del hierro intracelular y su homeostasis en función de la biodisponibilidad del hierro. Cuando los niveles de hierro celular son altos, la aconitasa se une a un grupo 4Fe-4S, catalizando la conversión de citrato a isocitrato (257). Este sustrato se metaboliza generando alfa-cetoglutarato y NADPH, un cofactor esencial para muchas reacciones

enzimáticas involucradas en el metabolismo de los lípidos (258). De acuerdo con esto, nuestros datos apoyan la hipótesis de que el metabolismo del hierro alterado en la mitocondria produce una deficiencia del hierro citosólico (hierro lábil reducido, LIP) y una mayor captación del hierro debido a una mayor expresión de transportadores de Fe^{2+} como es DMT1 y su posterior depósito en las mitocondrias y finalmente en gránulos de lipofusina (247). Este hecho explicaría porque los niveles de expresión de la proteína NFS1 y los niveles del grupo hemo se encontraron disminuidos en las células mutantes; puesto que sin hierro libre útil, la biosíntesis tanto de los centros Fe-S como del grupo hemo se encontraría alterada.

También hay que destacar que la proteína DMT1 lleva a cabo una función muy importante en la remodelación de los lípidos de membrana provocando un mal funcionamiento de estos, alteración que se ha descrito previamente en pacientes con mutaciones en PANK2 (245).

Como se ha señalado anteriormente, las células con esta patología sufren una alteración generalizada en sus membranas, las cuales no son autorenovadas adecuadamente; ello podría afectar a mecanismos como la mitofagia, la autofagia, el complejo UPR...etc, lo que conllevaría a una acumulación de hierro en complejos membranosos de forma no accesible para la célula. De hecho la ruta más importante de captación de hierro depende de un proceso de endocitosis mediado por la membrana plasmática, proceso que podría estar también dañado y ser otro punto de acumulación de hierro, lo cual explicaría el aumento de la proteína DMT1 en los pacientes.

Con el tratamiento del pantotenato ambas alteraciones presentes, la reducción del LIP y el aumento de los niveles de expresión DMT1, se restauraron parcialmente en los pacientes P1 y P2, pero no en el paciente P3 que presenta la proteína PANK2 completamente truncada. El hecho de que el tratamiento con pantotenato sea eficaz en las células que cuentan con alelos con mutaciones de cambio de sentido, y que por lo tanto podrían expresar una proteína residual, podría indicar que el tratamiento con pantotenato mejora la transcripción, traducción, disponibilidad o actividad de la enzima PANK2 o activa alguna ruta o proteína que complemente su actividad.

Igualmente, el tratamiento con pantotenato mejora la bioenergética celular en las células mutantes. De hecho, al realizar la prueba de mito estrés con el analizador de flujo XFe24, demostramos que los fibroblastos PKAN tenían valores reducidos de los parámetros más importantes de la función mitocondrial: respiración basal, respiración máxima, capacidad de respuesta y producción de ATP. El tratamiento con pantotenato incrementó los valores de todos los parámetros alterados. Este efecto podría deberse a la acción del pantotenato de actuar como sustrato de la enzima PANK2, en aquellos pacientes con enzima residual.

La PANK2 cataliza el paso limitante en la biosíntesis del CoA, y por lo tanto, las mutaciones en este gen tienen el potencial de alterar una serie de procesos metabólicos esenciales al disminuir el contenido de CoA celular (247). Como los niveles de CoA dependen tanto del suministro de pantotenato como del nivel de expresión de PANK2, una estrategia de tratamiento interesante sería aumentar los niveles de expresión de PANK2. Nuestro trabajo propone que la expresión deficiente de la PANK2 en las células de los pacientes puede estabilizarse mediante el tratamiento con pantotenato, y como consecuencia rescatar todas las alteraciones patológicas, incluidas los niveles de CoA. El pantotenato no tiene toxicidad conocida en humanos y las altas dosis orales de ácido pantoténico o pantotenato de sodio (hasta 10 gramos por vía oral durante varias semanas) no son tóxicas para los humanos.

Estudios recientes han demostrado que no hay una evidencia clara de la disminución del CoA en células o tejidos de los pacientes PKAN (248). Se han analizado los niveles de CoA en ratones Pank-KO, donde no se detectó disminución en los tejidos de dichos animales (248). Este estudio sugiere que la expresión de otras isoformas de la PANK pueden estar compensando la ausencia de la función PANK2.

En este trabajo, demostramos que a pesar de un gran aumento compensatorio de los niveles de expresión PANK1, la deficiencia de CoA se puede detectar en

las mitocondrias de los fibroblastos PKAN y que el tratamiento con pantotenato induce un aumento notable de los niveles de CoA en las células respondedoras. Estas observaciones sugieren que el pantotenato puede aumentar los niveles de expresión de PANK2 en fibroblastos de pacientes que albergan mutaciones particulares. Existen dos posibles mecanismos para explicar el efecto del pantotenato.

- 1) El pantotenato actúa aumentando los niveles de transcripción del gen de la PANK2.
- 2) El pantotenato estabiliza la propia enzima PANK2 evitando su degradación.

En la última parte de esta tesis, se describe la generación exitosa de neuronas inducidas mediante la reprogramación directa de los fibroblastos control y derivados de los pacientes con mutación PANK2.

En las NACH, específicamente en PKAN, se altera la homeostasis del hierro, produciendo depósitos patológicos en el SNC que generan especies reactivas de oxígeno potencialmente neurotóxicas: producen la reducción de H_2O_2 a $\cdot\text{OH}$ (hidroxilo), en la que el $\cdot\text{OH}$ formado actúa como agente oxidante muy potente que reacciona con compuestos orgánicos hasta la mineralización (249), o comportándose como actividad pseudoperoxidasa, produciendo radicales libres tóxicos (250).

Los ROS causan protoxinas bioactivas, señales celulares aberrantes, alteraciones bioenergéticas, disfunción proteosomal, agregación de proteínas, formación de inclusiones, sinaptólisis, apoptosis y necrosis. Sin embargo la falta de modelos animales adecuados ha obstaculizado la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.

El descubrimiento de las iPSC que son capaces de convertirse en cualquier tipo de célula diferenciada, ha sido un gran paso adelante en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas (141, 251 y 252) y obtener tipos celulares como las neuronas (253). Hasta ahora, varias enfermedades se han modelado *in vitro* utilizando células madre embrionarias o derivadas de las iPSC con resultados muy prometedores (254).

Un enfoque alternativo para evitar las desventajas de la generación de iPSC y la diferenciación posterior es la reprogramación somática directa a un tipo de célula particular sin pasar por un estado pluripotente intermedio (255). Este enfoque es adecuado para diferentes aplicaciones en modelos de muchas enfermedades genéticas para arrojar luz sobre la patogénesis de la enfermedad, la selección de fármacos y las pruebas de toxicidad de los fármacos.

La eficiencia de la reprogramación depende de varios factores como el protocolo de conversión, el tipo celular inicial y los genes neuronales que están sobreexpresados (157). Por ejemplo, el orden en que se colocan los genes de conversión en un vector lentiviral afecta a su nivel de expresión. Además, la edad de las células donantes, su número de pases...etc, podría limitar la eficiencia de la reprogramación.

En estos estudios se ha utilizado el método de conversión desarrollado por Drouin-Ouellet et. Al (256), obteniendo altas tasas de conversión que proporcionaron suficientes iNs para realizar los estudios oportunos. El porcentaje de eficiencia de conversión fue de un 37% en células control y un 22% en células PKAN.

Durante el proceso de reprogramación, se observó que las células derivadas de los pacientes PKAN mostraron una mayor tasa de muerte celular en comparación con las células control. Estos resultados indican que los fibroblastos PKAN son más sensibles metabólicamente a la hora de alcanzar la conversión y muchas células mueren durante el proceso, mientras que las que sobreviven al proceso de conversión llegan al estado neuronal. En cambio los fibroblastos control son más resistentes metabólicamente y pudieron sobrevivir un porcentaje mayor al proceso de conversión.

Otro parámetro importante en la reprogramación directa es la pureza neuronal (porcentaje de iNs en cultivo final), que determina la homogeneidad del cultivo celular. Curiosamente, en este trabajo, la pureza neuronal en los cultivos PKAN, las iNs fue significativamente mayor con un porcentaje del 60% mientras que en los controles fue de un 36%.

Una parte importante de este estudio fue el hallazgo de que las iNs derivadas de los pacientes PKAN acumulaban hierro al igual que los fibroblastos. Para ello se realizó la conversión de células mutantes PANK2 y fibroblastos control. Posteriormente, las iNs fueron tratadas durante 10 días con pantotenato a 500 μ M y a continuación se procedió a realizar la tinción de Azul de Prusia. De esta forma, pudimos comprobar que las neuronas mutantes acumulaban hierro. Igualmente demostramos que la acumulación de hierro estaba significativamente disminuida en las iNs mutantes tratadas con pantotenato.

Estas observaciones indican que el modelo de cribado en iNs es una herramienta útil para poder identificar las mutaciones en PANK2 con enzima residual y respondedoras a pantotenato.

Más importante aún, la existencia de una expresión enzimática residual que puede mejorarse significativamente en las células derivadas de algunos individuos afectados, sugiere la posibilidad de un tratamiento con dosis altas de pantotenato. Esta hipótesis debe ser confirmada comparando tanto el efecto de pantotenato en cultivos celulares y los estudios con pacientes en ensayos clínicos controlados. Además, esta aproximación proporcionaría una información muy valiosa sobre el comportamiento *in vitro* de las distintas mutaciones que alberga PANK2. El conocimiento de las mutaciones genéticas y su sensibilidad a la suplementación con pantotenato serán necesarias para allanar el camino hacia terapias personalizadas en PKAN.

Además, estos estudios pueden facilitar la detección de nuevos compuestos capaces de estabilizar los niveles de expresión y actividad de la enzima mutante.

En los últimos tiempos se han conseguido grandes avances en la investigación biomédica relacionada con numerosas enfermedades que presentan desestabilización de proteínas específicas. Se ha demostrado que moléculas pequeñas que funcionan como sustratos de las enzimas o como chaperonas farmacológicas, pueden rescatar la actividad de proteínas mutantes (259, 260, 261). Sin embargo, un trastorno concreto en función de sus alteraciones moleculares concretas será adecuado para el tratamiento con chaperonas farmacológicas u otro tipo de moléculas. (262).

Por ejemplo, hay varios casos de medicamentos que ya han sido aprobados y que han sido reposicionados con éxito como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de trastornos raros (263): doxorubicina, una antraciclina anticáncer, para la fibrosis quística (264); Diltiazem, un antihipertensivo, para la enfermedad de Gaucher (265); Ambroxol, un agente mucolítico, para la enfermedad de Fabry y Gaucher (266); Acetilcisteína, otro agente mucolítico, para la enfermedad de Pompe (267); pirimetamina, un fármaco antiparasitario, para la gangliosidosis GM2 (268); carbamazepine, una dibenzazepine, para la hipoglucemia hiperinsulinémica (269); y Salicylate, un agente antiinflamatorio bien conocido, para el síndrome de Pendred (270). Recientemente, un activador alostérico de la PANK2 que cruza la barrera hematoencefálica se ha identificado (PZ-2891) (271). La terapia con PZ-2891 mejoró la actividad locomotora y vida útil de un modelo de ratón knockout con deficiencia de CoA cerebral.

En esta tesis se han conseguido protocolizar las técnicas para el desarrollo de un cribado de fármacos para identificar posibles tratamientos en estas enfermedades neurodegenerativas.

La medicina de precisión se refiere a la adaptación del tratamiento médico a las características individuales de cada paciente. La aplicación de la medicina de precisión al tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la PKAN parece ser altamente prometedora en contraste con el tradicional "un medicamento para todos" (272). De hecho, las patologías neurodegenerativas pueden presentar características clínicas variables incluso en pacientes con la misma enfermedad o mutación, por lo tanto, es muy poco probable que se beneficie de un único medicamento. Las enfermedades neurológicas son modelos prometedores para la medicina de precisión, debido a la rápida expansión del conocimiento genético, la clasificación fenotípica, el desarrollo de biomarcadores y los posibles tratamientos (273). En este contexto, el desarrollo de la medicina de precisión utilizando los fibroblastos e iNs derivados de los pacientes PKAN podrían representar una excelente posibilidad para identificar tratamientos óptimos. En los últimos años, el conocimiento de las bases genéticas de las neurodegeneraciones asociadas a la acumulación neuronal de hierro, incluyendo PKAN y otros subtipos de NACH, ha mejorado enormemente usando

herramientas de diagnóstico basadas en secuenciación de paneles genéticos (274). (Fig D3).

En las enfermedades neurodegenerativas, la medicina de precisión ha tenido un gran avance en enfermedades como el Alzheimer. Por ejemplo, la terapia con anticuerpos monoclonales β -amiloide se está probando en pacientes con mutaciones conocidas que causan la enfermedad de Alzheimer con el objetivo de prevenir la neurodegeneración en pacientes genéticamente similares (el Ensayo de la Red de Alzheimer Heredada (DIAN) (Clinical Trials. número gov NCT01760005). Además, el genotipado de la apolipoproteína E tiene el potencial de identificar a las personas con riesgo de enfermedad de Alzheimer (275). Individuos con ciertas variaciones en este gen puede estar en mayor riesgo que la población general para desarrollar la enfermedad, lo que los convierte en candidatos ideales para un diagnóstico temprano, estrategias de tratamiento y prevención. Hoy en día, la enfermedad de Parkinson se trata como una condición, pero la investigación apunta hacia la presencia de diferentes subtipos, lo que podría dar oportunidades a la medicina de precisión. Aunque la terapia de reemplazo de dopamina o la manipulación de las vías dopaminérgicas del cerebro, y en particular la levodopa, tiene la capacidad de mejorar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, algunas complicaciones motoras aún obstaculizan las estrategias del tratamiento en la enfermedad de Parkinson (276). Sin embargo, la naturaleza compleja de todo este tipo de enfermedades neurodegenerativas junto con la heterogenidad fenotípica clínica que presentan, pueden relanzar la búsqueda de tratamientos personalizados.

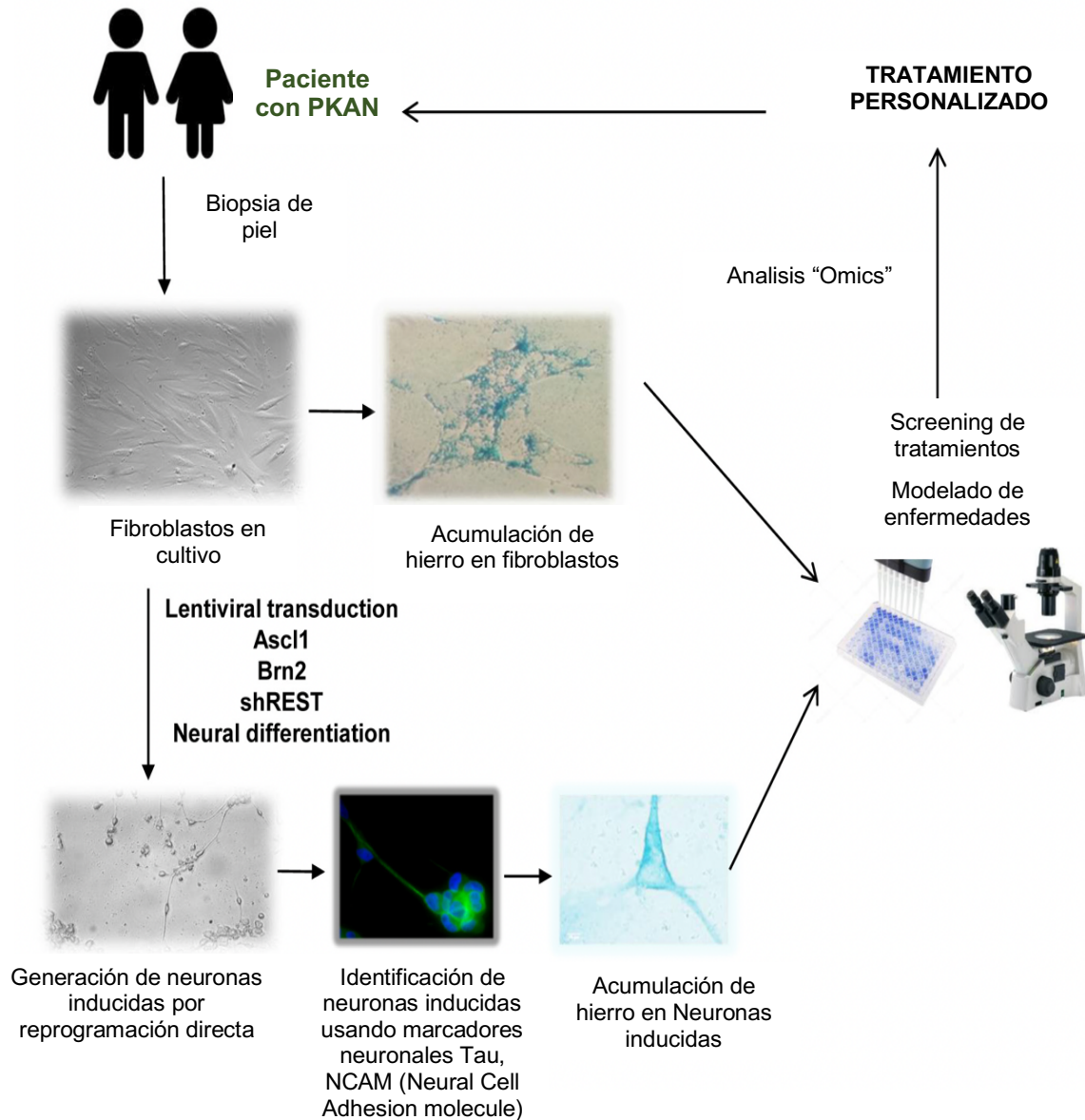


Fig D3: Modelos celulares de la enfermedad y estrategia para la detección de terapias farmacológicas para PKAN. Los fibroblastos y las neuronas inducidas derivadas de pacientes con PKAN pueden ser modelos celulares útiles para detectar alteraciones fisiopatológicas y herramientas valiosas para detectar posibles terapias.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en PANK2, muestran acumulación de hierro y lipofuscina, y una morfología celular senescente.
2. La alteración del metabolismo del hierro mitocondrial en las células PKAN, presentan una deficiencia de hierro libre citosólico, y una mayor absorción de hierro que se acumula en los gránulos de lipofuscina.
3. El tratamiento con pantotenato corrige las alteraciones patológicas dependiente del tipo de mutación en los fibroblastos PKAN.
4. Los niveles de expresión de la PANK2 pueden ser restaurados con pantotenato en los fibroblastos respondedores.
5. Las neuronas inducidas obtenidas por reprogramación directa de los fibroblastos mutantes acumulan hierro.
6. El tratamiento con pantotenato elimina la acumulación de hierro en las neuronas inducidas mutantes.
7. El tratamiento con pantotenato en los fibroblastos PKAN respondedores con enzima residual mejora significativamente la bioenergética celular.
8. Los fibroblastos y neuronas inducidas derivados de los pacientes con PKAN pueden ser modelos celulares útiles para comprender tanto los mecanismos patológicos subyacentes de la enfermedad como para el desarrollo de cribados que permitan identificar potenciales opciones terapéuticas.

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFÍA

1. Lieu P, Heiskala M, Peterson P, Yang Y: The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001;22:1–87.
2. Eisenstein R: Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 2000;20:627–662.
3. Rouault T: Systemic iron metabolism: A review and implications for brain iron metabolism. *Pediatr Neurol* 2001;25:130–137
4. D'Sa CM, Arthur RE Jr, States JC, Kuhn DM: Tryptophan hydroxylase: Cloning and expression of the rat brain enzyme in mammalian cells. *J Neurochem* 1996;67:900–906.
5. Connor JR, Menzies SL: Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia* 1996;17:83–93.
6. Connor JR, Pavlick G, Karli D, Menzies SL, Palmer C: A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1995;355:111–123
7. Connor JR, Snyder BS, Beard JL, Fine RE, Mufson EJ: Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1992; 31:327–335.
8. Aoki S, Okada Y, Nishimura K, Barkovich A, Kjos B, Brasch R, Norman D: Normal deposition of brain iron in childhood and adolescence: MR imaging at 1.5 T. *Radiology* 1989; 172:381–385
9. Bartzokis G, Beckson M, Hance D, Marx P, Foster J, Marder S: MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *Magn Reson Imaging* 1997;15:29–35.
10. Connor JR, Menzies SL, Burdo JR, Boyer PJ: Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr Neurol* 2001;25:118–129.
11. Beal MF: Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:211–223
12. Faucheux B, Hirsch E: Iron homeostasis and Parkinson's disease (in French). *Ann Biol Clin (Paris)* 1998;56(Spec No):23–30.
13. Fuqua, B. K., Vulpe, C. D. & Anderson, G. J. Intestinal iron absorption. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **26**, 115–119 (2012).

14. Ganz, T. & Nemeth, E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1434–1443 (2012)
15. Mastrogiannaki, M. *et al.* HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1159–1166 (2009).
16. Lambe, T. *et al.* Identification of a Steap3 endosomal targeting motif essential for normal iron metabolism. *Blood* **113**, 1805–1808 (2009).
17. Philpott, C. C. Coming into view: eukaryotic iron chaperones and intracellular iron delivery. *J. Biol. Chem.* **287**, 13518–13523 (2012).
18. Chen, W. *et al.* Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 16263–16268 (2009).
19. Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 589–599 (2009).
20. Cohen, L. A. *et al.* Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood* **116**, 1574–1584 (2010).
21. De Domenico, I. *et al.* Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.* **25**, 5396–5404 (2006)
22. Brightman, M. W., Klatzo, I., Olsson, Y. & Reese, T. S. The blood–brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J. Neurol. Sci.* **10**, 215–239 (1970).
23. Bradbury, M. W. Transport of iron in the blood–brain– cerebrospinal fluid system. *J. Neurochem.* **69**, 443–454 (1997).
24. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood– brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**, 1–13 (2004).
25. Moos, T. Brain iron homeostasis. *Dan. Med. Bull.* **49**, 279–301 (2002)
26. Wu, L. J. *et al.* Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood–brain barrier. *Brain Res.* **1001**, 108–117 (2004).
27. McCarthy, R. C. & Kosman, D. J. Ferroportin and exocytosomal ferroxidase activity are required for brain microvascular endothelial cell iron efflux. *J. Biol. Chem.* **288**, 17932–17940 (2013).

28. Moos, T., Rosengren Nielsen, T., Skjorringe, T. & Morgan, E. H. Iron trafficking inside the brain. *J. Neurochem.* **103**, 1730–1740 (2007).
29. Kono, S. Aceruloplasminemia. *Curr. Drug Targets* **13**, 1190–1199 (2012).
30. Tian, H., McKnight, S. L. & Russell, D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**, 72–82 (1997).
31. Rouault TA. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Aug;14
32. Majmundar, A. J., Wong, W. J. & Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* **40**, 294–309 (2010).
33. Verkhatsky, A. *et al.* Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* **4**, e00082 (2012).
34. Zakin, M. M., Baron, B. & Guillou, F. Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev. Neurosci.* **24**, 222–226 (2002).
35. Rouault, T. A. & Cooperman, S. Brain iron metabolism. *Semin. Pediatr. Neurol.* **13**, 142–148 (2006).
36. Rouault, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature Chem. Biol.* **2**, 406–414 (2006).
37. Connor, J. R., Menzies, S. L., St Martin, S. M. & Mufson, E. J. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J. Neurosci. Res.* **27**, 595–611 (1990). .
38. Todorich, B., Zhang, X. & Connor, J. R. H-ferritin is the major source of iron for oligodendrocytes. *Glia* **59**, 927–935 (2011).
39. Hadziahmetovic, M. *et al.* Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 2728–2736 (2008).
40. Paradowski, M., Lobos, M., Kuydowicz, J., Krakowiak, M. & Kubasiewicz-Ujma, B. Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis. *Clin. Biochem.* **28**, 459–466 (1995)
41. Jeong, S. Y. & David, S. Glycosylphosphatidylinositol- anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **278**, 27144–27148 (2003).
42. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).

43. Anderson, C. P., Shen, M., Eisenstein, R. S. & Leibold, E. A. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1468–1483 (2012)
44. Meyron-Holtz, E. G. *et al.* Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.* **23**, 386–395 (2004). .
45. Ruiz, J. C., Walker, S. D., Anderson, S. A., Eisenstein, R. S. & Bruick, R. K. F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5) is required for maintenance of cellular and systemic iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **288**, 552–560 (2012).
46. Schulz, K., Vulpe, C. D., Harris, L. Z. & David, S. Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter. *J. Neurosci.* **31**, 13301–13311 (2011).
47. Hallgren, B. & Sourander, P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J. Neurochem.* **3**, 41–51 (1958).
48. Hill, J. M. & Switzer, R. C. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* **11**, 595–603 (1984).
49. Koeppen, A. H. The history of iron in the brain. *J. Neurol. Sci.* **134** (Suppl.), 1–9 (1995).
50. Gelman, N. *et al.* MR imaging of human brain at 3.0 T: preliminary report on transverse relaxation rates and relation to estimated iron content. *Radiology* **210**, 759–767 (1999).
51. Koeppen, A. H. A brief history of brain iron research. *J. Neurol. Sci.* **207**, 95–97 (2003).
52. Zecca, L., Youdim, M. B., Riederer, P., Connor, J. R. & Crichton, R. R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Rev. Neurosci.* **5**, 863–873 (2004).
53. Sullivan, E. V., Adalsteinsson, E., Rohlfing, T. & Pfefferbaum, A. Relevance of iron deposition in deep gray matter brain structures to cognitive and motor performance in healthy elderly men and women: exploratory findings. *Brain Imaging Behav.* **3**, 167–175 (2009).
54. Vicente, A. M. & Costa, R. M. Looking at the trees in the central forest: a new pallidal-striatal cell type. *Neuron* **74**, 967–969 (2012)

55. Garden, G. A. & Möller, T. Microglia biology in health and disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **1**, 127–137 (2006).
56. Cheepsunthorn, P., Radov, L., Menzies, S., Reid, J. & Connor, J. R. Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. *Glia* **35**, 53–62 (2001).
57. Gerlach, M., Double, K. L., Youdim, M. B. & Riederer, P. Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J. Neural Transm.* **70** (Suppl.), 133–142 (2006).
58. Hare, D. J., Gerlach, M. & Riederer, P. Considerations for measuring iron in post-mortem tissue of Parkinson's disease patients. *J. Neural Transm.* **119**, 1515–1521 (2012). .
59. Sian-Hulsmann, J., Mandel, S., Youdim, M. B. & Riederer, P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **118**, 939–957 (2011). .
60. Simmons, D. A. *et al.* Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia* **55**, 1074–1084 (2007).
61. Schrag, M., Mueller, C., Oyoyo, U., Smith, M. A. & Kirsch, W. M. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta- analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog. Neurobiol.* **94**, 296–306 (2011).
62. Ayton, S., Lei, P. & Bush, A. I. Metallostasis in Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* [http://dx. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.558](http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.558) (2012). 55.
63. Bush, A. I. The metal theory of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **33**, S277–S281 (2013).
64. House, M. J. *et al.* Correlation of proton transverse relaxation rates (R2) with iron concentrations in postmortem brain tissue from alzheimer's disease
65. Roy C, Andrews N: Recent advances in disorders of iron metabolism: Mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2181–2186
66. Rouault T: Iron on the brain. *Nat Genet* 2001; 279. 28:299–300

67. Coburn B: Neurodegeneration: Iron weighs in. *Clin Genet* 2001;60:267–269
68. Chiueh CC: Iron overload, oxidative stress, and axonal dystrophy in brain disorders. *Pe- diatr Neurol* 2001;25:138–147.
69. Hirsch E, Faucheux B: Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13(suppl 1):39–45.
70. Castellani RJ, Siedlak SL, Perry G, Smith MA; Sequestration of iron by Lewy bodies in Par- kinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;100:111–114.
71. Hashimoto M, Hsu LJ, Xia Y, Takeda A, Sisk A, Sundsmo M, Masliah E: Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein *in vitro*. *Neuroreport* 1999;10:717–721.
72. Hara Y, Chuda M, Kuroda S, Hayabara T: Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: Re- lationship to clinical data. *J Neurol Sci* 1999; 170:90–95
73. Miyajima H, Fujimoto M, Kohno S, Kaneko E, Gitlin JD: CSF abnormalities in patients with aceruloplasminemia. *Neurology* 1998;51: 1188–1190.
74. Yoshida K, Kaneko K, Miyajima H, Tokuda T, Nakamura A, Kato M, Ikeda S: Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasmi- nemia patients. *J Neurol Sci* 2000;175:91–95
75. McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isac-son O, Jenner P: Failure of the ubiquitin-pro- 58. teasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:589–594.
76. McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isac-son O, Jenner P: Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:589–594
77. Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Muf-son EJ: A histochemical study of iron, transfer-rin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* 1992;31:75–83. 222.
78. Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, Maggio JE: Alumin- um, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem* 1993;61:1171–1174.

79. Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN: Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem* 1999;274:6421–6431.
80. Beard J, Connor J, Jones B: Brain iron: Location and function. *Prog Food Nutr Sci* 1993;17: 183–221.
81. Beard J, Connor J, Jones B: Iron in the brain. *Nutr Rev* 1993;51:157–170.
82. Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G: Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9866–9868
83. Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA: In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: A central role for bound transition metals. *J Neurochem* 2000;74:270– 279
84. Schipper HM: Heme oxygenase-1: Role in brain aging and neurodegeneration. *Exp Gerontol* 2000;35:821–830
85. Jefferies WA, Food MR, Gabathuler R, Rothberger S, Yamada T, Yasuhara O, McGeer PL: Reactive microglia specifically associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain tissue express melanotransferrin. *Brain Res* 1996;712:122–126.
86. On the structural form of iron in ferritin cores associated with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47(Online Pub): OL49-OL50.
87. Dobson J: Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease. *FEBS Lett* 2001; 496:1–5.
88. Smith MA, Wehr K, Harris PL, Siedlak SL, Connor JR, Perry G: Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998;788:232–236.
89. LaVaute T, Smith S, Cooperman S, Iwai K, Land W, Meyron-Holtz E, Drake S, Miller G, Abu-Asab M, Tsokos M, Switzer R III, Grinberg A, Love P, Tresser N, Rouault T: Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat Genet* 2001;27:209–214.

90. Kim DK, Seo MY, Lim SW, Kim S, Kim JW, Carroll BJ, Kwon DY, Kwon T, Kang SS: Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:84–90.
91. Kim DK, Seo MY, Lim SW, Kim S, Kim JW, Carroll BJ, Kwon DY, Kwon T, Kang SS: Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:84–90.
92. Ujiié M, Dickstein DL, Jefferies WA: p97 as a biomarker for Alzheimer disease. *Front Biosci* 2002;7:E42–E47
93. Double KL, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P: Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2000;60:37–58
94. Bartzokis G, Cummings J, Perlman S, Hance D, Mintz J: Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch Neurol* 1999;56: 569–574.
95. Bartzokis G, Cummings J, Markham C, Marmarelis P, Treciokas L, Tishler T, Marder S, Mintz J: MRI evaluation of brain iron in earlier and later-onset Parkinson's disease and normal subjects. *Magn Reson Imaging* 1999;17:213–222
96. Good PF, Olanow CW, Perl DP: Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: A LAMMA study. *Brain Res* 1992; 593:343–346
97. Fernandez-Gonzalez A, Perez-Otano I, Morgan JI: MPTP selectively induces haem oxygenase-1 expression in striatal astrocytes. *Eur J Neurosci* 2000;12:1573–1583.
98. Faucheux BA, Nillesse N, Damier P, Spik G, Mouatt-Prigent A, Pierce A, Leveugle B, Kubis N, Hauw JJ, Agid Y: Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9603–9607.
99. Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Sipe JC, Beutler E: Mutations in iron-regulatory protein 2 (IRP2) and lack of association with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002, in press.
100. Campuzano V, Montermini L, Molto M, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A: Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996;271:1423–1427.

101. Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish S, Faucheux B, Trouillas P, Authier F, Durr A, Mandel J, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M: Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 1997;6:1771– 1780.
102. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH: Clinical, bio- chemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 2000;9: 275–282.
103. Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P: Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 1997;17:215–217.
104. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007; 369:218–28. [PubMed: 17240289]
105. Hilditch-Maguire P, Trettel F, Passani LA, Auerbach A, Persichetti F, MacDonald ME. Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:2789–97. [PubMed: 11092755]
106. Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res*. 2007; 32:1655–64. [PubMed: 17484051]
107. Bartzokis G, Cummings J, Perlman S, Hance DB, Mintz J. Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch Neurol*. 1999; 56:569–74. [PubMed: 10328252]
108. Jurgens CK, Jasinschi R, Ekin A, et al. MRI T2 Hypointensities in basal ganglia of premanifest Huntington's disease. *PLoS Curr*. 2010; 8:RRN1173.
109. Gregory, A., Polster, B. J., and Hayflick, S. J. (2009) Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation, *Journal of medical genetics* 46, 73-80.
110. 2. Hayflick, S. J., Westaway, S. K., Levinson, B., Zhou, B., Johnson, M. A., Ching, K. H., and Gitschier, J. (2003) Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome, *The New England journal of medicine* 348, 33-40.

111. Di Meo, I., and Tiranti, V. (2018) Classification and molecular pathogenesis of NBIA syndromes, *Eur J Paediatr Neurol* 22, 272-284.
112. Arber, C. E., Li, A., Houlden, H., and Wray, S. (2015) Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: unifying theories, *Neuropathology and applied neurobiology*.
113. Levi, S., and Finazzi, D. (2014) Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms, *Frontiers in pharmacology* 5, 99.
114. A. Gregory and S. Hayflick, "Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview." University of Washington, Seattle, 24-Apr-2014.
115. "Asociación española Hallervorden Spatz: Entender la enfermedad." [Online]. Available: <http://enachasociacion.blogspot.com/2013/03/entender-la-enfermedad.html>. [Accessed: 02-Mar-2015].
116. <http://bloodgenetics.com/panel-neurodegeneracion-acumulacion-hierro-cerebro-nbia-codigo-10120/>
117. P. Venco, S. Dusi, L. Valletta, and V. Tiranti, "Alteration of the coenzyme A biosynthetic pathway in neurodegeneration with brain iron accumulation syndromes," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 4, pp. 1069–74, 2014.
118. E. Meyer, M. a. Kurian, and S. J. Hayflick, "Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 16, no. 1, p. 150514142628008, 2014.
119. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, et al. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885–89
120. <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/13204/neurodegeneracion-asociada-a-la-proteina-beta-propeller>
121. K. Poplawska-Domaszewicz, J. Florczak-Wyspiańska, and W. Kozubsky, "Update on neurodegeneration with brain iron accumulation," vol. 8, pp. 2–9, 2014.

122. Y. M. Zhang, C. O. Rock, and S. Jackowski, "Biochemical properties of human pantothenate kinase 2 isoforms and mutations linked to pantothenate kinase-associated neurodegeneration," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 1, pp. 107–114, 2006.
123. "Orphanet: Neurodegeneración con acúmulo cerebral de hierro," 2010. [Online]. Available: http://www.orpha.net/consor/cgibin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=385. [Accessed: 02-Mar-2015].
124. "OMIM Entry - # 234200 - NEURODEGENERATION WITH BRAIN IRON ACCUMULATION 1; NBIA1." [Online]. Available: <http://www.omim.org/entry/234200>. [Accessed: 02-Mar-2015].
125. S. J. Hayflick, S. K. Westaway, B. Levinson, B. Zhou, M. a Johnson, K. H. L. Ching, and J. Gitschier, "Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 1, pp. 33–40, 2003.
126. S. C. Grünert, "Clinical and genetical heterogeneity of late-onset multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 9, p. 117, 2014.
127. "levodopa | C9H11NO4 - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/levodopa#section=Pharmacology-and-Biochemistry>. [Accessed: 07-Sep-2015].
128. M. C. Heras Ballestro, M. a. Garcia Martin, and F. Garcia Gonzalez, "Quelantes Del Hierro: Situacion Actual Y Perspectivas Terapeuticas," *Farm. Hosp.*, vol. 19, no. 6, pp. 323–329, 1995.
129. M. Daugherty, B. Polanuyer, M. Farrell, M. Scholle, A. Lykidis, and V. De Crécy-Lagard, "Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 24, pp. 21431–21439, 2002.
130. B. Srinivasan and O. C. M. Sibon, "Coenzyme A, more than 'just' a metabolic cofactor," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 4, pp. 1075–1079, 2014.
131. L. E. Dansie, S. Reeves, K. Miller, S. P. Zano, M. Frank, C. Pate, J. Wang, and S. Jackowski, "Physiological roles of the pantothenate kinases," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 4, pp. 1033–1036, 2014.

132. P. Note, "Report for Pathway Review."
133. E. Meyer, M. a. Kurian, and S. J. Hayflick, "Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation: Genetic Diversity and Pathophysiological Mechanisms," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 16, no. 1, p. 150514142628008, 2014.
134. K. Siudeja, B. Srinivasan, L. Xu, A. Rana, J. de Jong, E. a a Nollen, S. Jackowski, L. Sanford, S. Hayflick, and O. C. M. Sibon, "Impaired Coenzyme A metabolism affects histone and tubulin acetylation in *Drosophila* and human cell models of pantothenate kinase associated neurodegeneration," *EMBO Mol. Med.*, vol. 3, no. 12, pp. 755–766, 2011.
135. R. N. Saha and K. Pahan, "HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis.," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 4, pp. 539–550, 2006.
136. "Structural Biochemistry/Enzyme Regulation/Acetylation - Wikibooks, open books for an open world." [Online]. Available: https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme_Regulation/Acetylation. [Accessed: 12-Aug-2015].
137. D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, "Autophagy: cellular and molecular mechanisms," *J. Pathol.*, vol. 221, no. 1, pp. 3–12, 2010.
138. F. McCoy, R. Darbandi, H. Lee, K. Bharatham, T. Moldoveanu, C. R. Grace, K. Dodd, W. Lin, S. I. Chen, R. P. Tangallapally, M. Kurokawa, R. E. Lee, A. a. Shelat, T. Chen, D. R. Green, R. a. Harris, S. H. Lin, R. a. Fissore, R. J. Colbran, and L. K. Nutt, "Metabolic Activation of CaMKII by Coenzyme A," *Mol. Cell*, vol. 52, no. 3, pp. 325–339, 2013.
139. D. Brunetti, S. Dusi, M. Morbin, A. Uggetti, F. Moda, I. D'Amato, C. Giordano, G. d'Amati, A. Cozzi, S. Levi, S. Hayflick, and V. Tiranti, "Pantothenate kinase-associated neurodegeneration: altered mitochondria membrane potential and defective respiration in Pank2 knock-out mouse model," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 24, pp. 5294–5305, 2012.
140. Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):141

141. Christophe Heinrich, Francesca M. Spagnoli, Benedikt Berninger. In vivo reprogramming for tissue repair. *Nat Cell Biol.* 2015 Mar; 17(3): 204–211.
142. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000 (1987).
143. Choi, J. *et al.* MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7988-7992 (1990).
144. Weintraub, H. *et al.* Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5434-5438 (1989)
145. Feng, R. *et al.* PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6057-6062, doi:10.1073/pnas.0711961105 (2008).
146. Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**, 663-676 (2004).
147. Ieda, M. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-386, doi:10.1016/j.cell.2010.07.002 (2010).
148. Qian, L. *et al.* In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* **485**, 593-598, doi:10.1038/nature11044 (2012).
149. Song, K. *et al.* Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* **485**, 599-604, doi:10.1038/nature11139 (2012).
150. Heinrich, C. *et al.* Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* **8**, e1000373, doi:10.1371/journal.pbio.1000373 (2010).
151. Heins, N. *et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* **5**, 308-315, doi:10.1038/nn828 (2002).

152. Berninger, B. *et al.* Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* **27**, 8654-8664, doi:10.1523/JNEUROSCI.1615-07.2007 (2007).
153. Vierbuchen, T. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041, doi:10.1038/nature08797 (2010).
154. Pang, Z. P. *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* **476**, 220-223, doi:10.1038/nature10202 (2011).
155. Passeri, E. *et al.* Enhanced conversion of induced neuronal cells (iN cells) from human fibroblasts: Utility in uncovering cellular deficits in mental illness- associated chromosomal abnormalities. *Neurosci Res* **101**, 57-61, doi:10.1016/j.neures.2015.07.011 (2015).
156. Pfisterer, U. *et al.* Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell Cycle* **10**, 3311-3316, doi:10.4161/cc.10.19.17584 (2011).
157. Caiazzo, M. *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* **476**, 224-227, doi:10.1038/nature10284 (2011).
158. Ladewig, J., Koch, P. & Brustle, O. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 225-236, doi:10.1038/nrm3543 (2013).
159. Yoo, A. S. *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* **476**, 228-231, doi:10.1038/nature10323 (2011).
160. Richner, M., Victor, M. B., Liu, Y., Abernathy, D. & Yoo, A. S. MicroRNA- based conversion of human fibroblasts into striatal medium spiny neurons. *Nat Protoc* **10**, 1543-1555, doi:10.1038/nprot.2015.102 (2015).
161. Victor, M. B. *et al.* Generation of human striatal neurons by microRNA- dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron* **84**, 311-323, doi:10.1016/j.neuron.2014.10.016 (2014).

162. Xue, Y. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* **152**, 82-96, doi:10.1016/j.cell.2012.11.045 (2013).
163. Jorgensen, H. F. *et al.* REST selectively represses a subset of RE1-containing neuronal genes in mouse embryonic stem cells. *Development* **136**, 715-721, doi:10.1242/dev.028548 (2009).
164. Ladewig, J. *et al.* Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods* **9**, 575-578, doi:10.1038/nmeth.1972 (2012).
165. Hu, W. *et al.* Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell* **17**, 204-212, doi:10.1016/j.stem.2015.07.006 (2015).
166. Liu, M. L. *et al.* Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun* **4**, 2183, doi:10.1038/ncomms3183 (2013).
167. Wang, P. *et al.* Generation of patient-specific induced neuronal cells using a direct reprogramming strategy. *Stem Cells Dev* **23**, 16-23, doi:10.1089/scd.2013.0131 (2014).
168. Xue, Y. *et al.* Sequential regulatory loops as key gatekeepers for neuronal reprogramming in human cells. *Nat Neurosci* **19**, 807-815, doi:10.1038/nn.4297 (2016).
169. Drouin-Ouellet, J. *et al.* REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO molecular medicine* **9**, 1117-1131, doi:10.15252/emmm.201607471 (2017).
170. Pfisterer, U. *et al.* Small molecules increase direct neural conversion of human fibroblasts. *Sci Rep* **6**, 38290, doi:10.1038/srep38290 (2016).
171. Drouin-Ouellet, J., Piracs, K., Barker, R. A., Jakobsson, J. & Parmar, M. Direct Neuronal Reprogramming for Disease Modeling Studies Using Patient-Derived Neurons: What Have We Learned? *Front Neurosci* **11**, 530, doi:10.3389/fnins.2017.00530 (2017).

172. Shrigley, S., Piracs, K., Barker, R. A., Parmar, M. & Drouin-Ouellet, J. Simple Generation of a High Yield Culture of Induced Neurons from Human Adult Skin Fibroblasts. *J Vis Exp*, doi:10.3791/56904 (2018).
173. Schwab, A. J. & Ebert, A. D. Neurite Aggregation and Calcium Dysfunction in iPSC-Derived Sensory Neurons with Parkinson's Disease-Related LRRK2 G2019S Mutation. *Stem Cell Reports* **5**, 1039-1052, doi:10.1016/j.stemcr.2015.11.004 (2015).
174. Mertens, J. *et al.* Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging- Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell* **17**, 705-718, doi:10.1016/j.stem.2015.09.001 (2015).
175. Huh, C. J. *et al.* Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.18648 (2016).
176. Liu, M. L., Zang, T. & Zhang, C. L. Direct Lineage Reprogramming Reveals Disease-Specific Phenotypes of Motor Neurons from Human ALS Patients. *Cell Rep* **14**, 115-128, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.018 (2016).
177. Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* **14**, R115, doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115 (2013).
178. Miura, K. *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* **27**, 743-745, doi:10.1038/nbt.1554 (2009).
179. Masserdotti, G. *et al.* Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* **17**, 74- 88, doi:10.1016/j.stem.2015.05.014 (2015).
180. Price, J. D. *et al.* The Ink4a/Arf locus is a barrier to direct neuronal transdifferentiation. *J Neurosci* **34**, 12560-12567, doi:10.1523/JNEUROSCI.3159- 13.2014 (2014).
181. Chanda, S. *et al.* Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports* **3**, 282-296, doi:10.1016/j.stemcr.2014.05.020 (2014)
182. Bavamian, S. *et al.* Dysregulation of miR-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* **20**, 573-584, doi:10.1038/mp.2014.176 (2015).

183. Puschmann, A. *et al.* Heterozygous PINK1 p.G411S increases risk of Parkinson's disease via a dominant-negative mechanism. *Brain* **140**, 98-117, doi:10.1093/brain/aww261 (2017).
184. Liu, Y. *et al.* Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation. *PLoS One* **9**, e109621, doi:10.1371/journal.pone.0109621 (2014).
185. Lim, S. M. *et al.* Directly converted patient-specific induced neurons mirror the neuropathology of FUS with disrupted nuclear localization in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener* **11**, 8, doi:10.1186/s13024-016-0075-6 (2016).
186. Santambrogio, P. *et al.* Mitochondrial iron and energetic dysfunction distinguish fibroblasts and induced neurons from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients. *Neurobiol Dis* **81**, 144-153, doi:10.1016/j.nbd.2015.02.030 (2015).
187. Zhang, Q. J. *et al.* Modeling the phenotype of spinal muscular atrophy by the direct conversion of human fibroblasts to motor neurons. *Oncotarget* **8**, 10945- 10953, doi:10.18632/oncotarget.14641 (2017).
188. Xiao, D. *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by single non-neural progenitor transcription factor Ptf1a. *Nat Commun* **9**, 2865, doi:10.1038/s41467-018-05209-1 (2018).
189. Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L. & Bjorklund, A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **12**, 84-91, doi:10.1016/S1474-4422(12)70295-8 (2013).
190. Kefalopoulou, Z. *et al.* Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurol* **71**, 83-87, doi:10.1001/jamaneurol.2013.4749 (2014).
191. Torper, O. & Gotz, M. Brain repair from intrinsic cell sources: Turning reactive glia into neurons. *Prog Brain Res* **230**, 69-97, doi:10.1016/bs.pbr.2016.12.010 (2017).
192. Buffo, A. *et al.* Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18183-18188, doi:10.1073/pnas.0506535102 (2005).

193. Gascon, S., Masserdotti, G., Russo, G. L. & Gotz, M. Direct Neuronal Reprogramming: Achievements, Hurdles, and New Roads to Success. *Cell Stem Cell* **21**, 18-34, doi:10.1016/j.stem.2017.06.011 (2017).
194. <http://www.bioscirep.org/content/38/3/BSR20171650>
195. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. Current protocols in human genetics/editorial board, Jonathan L Haines [et al. Chapter 7:Unit7 20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>).
196. (Zhou B, Westaway SK, Levinson B, Johnson MA, Gitschier J, Hayflick SJ (2001) A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat Genet* 28(4):345– 349)
197. (Campanella A, Privitera D, Guaraldo M, Rovelli E, Barzaghi C, Garavaglia B, Santambrogio P, Cozzi A et al (2012) Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron- handling properties. *Hum Mol Genet* 21(18):4049–4059. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds229>)
198. [Dang TN, Bishop GM, Dringen R, Robinson SR (2010) The putative heme transporter HCP1 is expressed in cultured astrocytes and contributes to the uptake of hemin. *Glia* 58(1):55–65]
199. Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331(2):370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.049>
200. Tarohda T, Ishida Y, Kawai K, Yamamoto M, Amano R (2005) Regional distributions of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats. *Anal Bioanal Chem* 383(2):224–234. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3423-x>
201. [Boulton M, Marshall J (1985) Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Exp Eye Res* 41(2):209–218].
202. [Biesemeier A, Schraermeyer U, Eibl O (2011) Quantitative chemical analysis of ocular melanosomes in stained and non-stained tissues. *Micron* 42(5):461–470. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.01.004>]

203. [Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265–275].
204. Rodriguez-Hernandez, A. *et al.* Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* **5**, 19-32 (2009).
205. , Swaiman KF, Smith SA, Trock GL, Siddiqui AR (1983) Sea-blue histiocytes, lymphocytic cytosomes, movement disorder and ⁵⁹Fe- uptake in basal ganglia: Hallervorden-Spatz disease or ceroid storage disease with abnormal isotope scan? *Neurology* 33(3):301–305]
206. Santambrogio P, Erba BG, Campanella A, Cozzi A, Causarano V, Cremonesi L, Galli A, Della Porta MG *et al* (2011) Over-expression of mitochondrial ferritin affects the JAK2/STAT5 pathway in K562 cells and causes mitochondrial iron accumulation. *Haematologica* 96(10):1424–1432. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.042952>
207. [Shibata K, Nakai T, Fukuwatari T (2012) Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of coenzyme A, dephospho-coenzyme A, and acetyl-coenzyme A in normal and pantothenic acid-deficient rats. *Anal Biochem* 430(2):151– 155- <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.010>].
208. Rodriguez-Arribas M, Pizarro-Estrella E, Gomez-Sanchez R, Yakhine-Diop SM, Gragera-Hidalgo A, Cristo A, Bravo-San Pedro JM, Gonzalez-Polo RA *et al* (2016) IFDOTMETER: a new software
209. application for automated immunofluorescence analysis. *J Lab Autom* 21(2):246–259. <https://doi.org/10.1177/2211068215600650>
210. Nicholls, D. G. *et al.* Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J Vis Exp*, doi:10.3791/2511 (2010).
211. [Drouin-Ouellet J, Lau S, Brattas PL, Rylander Ottosson D, Pircs K, Grassi DA, Collins LM, Vuono R *et al* (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol Med* 9(8):1117–1131. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607471> ,
212. Shrigley S, Pircs K, Barker RA, Parmar M, Drouin-Ouellet J (2018) Simple generation of a high yield culture of induced neurons from human adult skin fibroblasts. *J Vis Exp* 132. <https://doi.org/10.3791/56904>].

213. [Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15(9):871–875. <https://doi.org/10.1038/nbt0997-871>].
214. [Campanella A, Privitera D, Guaraldo M, Rovelli E, Barzaghi C, Garavaglia B, Santambrogio P, Cozzi A et al (2012) Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron-handling properties. *Hum Mol Genet* 21(18):4049–4059. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds229>].
215. [Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331(2):370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.049>].
216. [Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331(2):370–375. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.049>].
217. [Luckenbach MW, Green WR, Miller NR, Moser HW, Clark AW, Tennekoon G (1983) Ocular clinicopathologic correlation of Hallervorden-Spatz syndrome with acanthocytosis and pigmentary retinopathy. *Am J Ophthalmol* 95(3):369–382
218. Defendini R, Markesbery WR, Mastri AR, Duffy PE (1973) Hallervorden-Spatz disease and infantile neuroaxonal dystrophy. Ultrastructural observations, anatomical pathology and nosology. *J Neurol Sci* 20(1):7–23 , Park BE, Netsky MG, Betsill WL Jr (1975) Pathogenesis of pigment and spheroid formation in Hallervorden-Spatz syndrome and related disorders. *Neurology* 25(12):1172–1178]
219. [Bindewald-Wittich A, Han M, Schmitz-Valckenberg S, Snyder SR, Giese G, Bille JF, Holz FG (2006) Two-photon-excited fluorescence imaging of human RPE cells with a femtosecond Ti:sapphire laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10):4553–4557. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1562>
220. [Newbury DE, Ritchie NW (2015) Performing elemental microanalysis with high accuracy and high precision by scanning electron microscopy/silicon drift detector energy-dispersive X-ray spectrometry

- (SEM/SDD-EDS). *J Mater Sci* 50(2):493–518. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8685-2>],
221. [Levi S, Finazzi D (2014) Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms. *Front Pharmacol* 5:99].
 222. [Shioji K, Oyama Y, Okuma K, Nakagawa H (2010) Synthesis and properties of fluorescence probe for detection of peroxides in mitochondria. *Bioorg Med Chem Lett* 20(13):3911–3915. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.017>].
 223. Gregory A, Polster BJ, Hayflick SJ (2009) Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *J Med Genet* 46(2):73–80
 224. Hayflick SJ, Westaway SK, Levinson B, Zhou B, Johnson MA, Ching KH, Gitschier J (2003) Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *N Engl J Med* 348(1): 33–40
 225. Di Meo I, Tiranti V (2018) Classification and molecular pathogenesis of NBIA syndromes. *Eur J Paediatr Neurol* 22(2):272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2018.01.008>
 226. Santambrogio P, Dusi S, Guaraldo M, Rotundo LI, Broccoli V, Garavaglia B, Tiranti V, Levi S (2015) Mitochondrial iron and energetic dysfunction distinguish fibroblasts and induced neurons from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients. *Neurobiol Dis* 81:144–153. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.02.030>
 227. <https://blog.nutritienda.com/acido-pantotenico/>
 228. Nunez MT, Urrutia P, Mena N, Aguirre P, Tapia V, Salazar J (2012) Iron toxicity in neurodegeneration. *Biometals* 25(4):761–776. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9523-0>
 229. Lan AP, Chen J, Chai ZF, Hu Y (2016) The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *Biometals* 29(4):665–678. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9942-4>
 230. Salvador GA, Uranga RM, Giusto NM (2010) Iron and mechanisms of neurotoxicity. *Int J Alzheimers Dis* 2011:720658– 720659. <https://doi.org/10.4061/2011/720658>

231. Kruer MC (2013) The neuropathology of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Int Rev Neurobiol* 110:165–194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00009-0>
232. Matsunaga T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Dhanasekaran A, Joseph J, Kalyanaraman B (2004) Ceramide-induced intracellular oxidant formation, iron signaling, and apoptosis in endothelial cells: protective role of endogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 279(27):28614–28624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400977200>
233. König J, Ott C, Hugo M, Jung T, Bulteau AL, Grune T, Hohn A (2017) Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol* 11:673–681. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.017>
234. Frolova MS, Surin AM, Braslavski AV, Vekshin NL (2015) Degradation of mitochondria to lipofuscin upon heating and illumination. *Biofizika* 60(6):1125–1131
235. Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33(5):611–619
236. Jung T, Bader N, Grune T (2007) Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1119:97–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.008>
237. Powell SR, Wang P, Divald A, Teichberg S, Haridas V, McCloskey TW, Davies KJ, Katzeff H (2005) Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic Biol Med* 38(8):1093–1101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.003>
238. Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT (2008) Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1780(11):1291–1303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.009>
239. Hohn A, Grune T (2013) Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 1:140–144. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.006>
240. Jolly RD, Douglas BV, Davey PM, Roiri JE (1995) Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 41(Suppl 2):283–295

241. Reeg S, Grune T (2015) Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? *Antioxid Redox Signal* 23(3):239–255. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6062>
242. Defendini R, Markesbery WR, Mastro AR, Duffy PE (1973) Hallervorden-Spatz disease and infantile neuroaxonal dystrophy. Ultrastructural observations, anatomical pathology and nosology. *J Neurol Sci* 20(1):7–23
243. Park BE, Netsky MG, Betsill WL Jr (1975) Pathogenesis of pigment and spheroid formation in Hallervorden-Spatz syndrome and related disorders. *Neurology* 25(12):1172–1178
244. Lill R, Srinivasan V, Muhlenhoff U (2014) The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Curr Opin Microbiol* 22:111–119. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.015>
245. Lu C, Cortopassi G (2007) Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Arch Biochem Biophys* 457(1):111–122. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.09.010>
246. Orellana DI, Santambrogio P, Rubio A, Yekhlief L, Cancellieri C, Dusi S, Giannelli SG, Venco P et al (2016) Coenzyme A corrects pathological defects in human neurons of PANK2-associated neurodegeneration. *EMBO Mol Med* 8(10):1197–1211. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606391>
247. Poli M, Derosas M, Lusciati S, Cavadini P, Campanella A, Verardi R, Finazzi D, Arosio P. Pantothenate kinase-2 (PANK2) silencing causes cell growth reduction, cell-specific ferroportin upregulation and iron deregulation. *Neurobiol Dis.* 2010 Aug 39(2):204–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.04.009>. Epub 2010 Apr 23
248. Huang ML, Lane DJ, Richardson DR (2011) Mitochondrial mayhem: the mitochondrion as a modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxid Redox Signal* 15(12):3003–3019. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3921>

249. Leonardi R, Jackowski S (2007) Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. *EcoSal Plus* 2(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.4>
250. KUSVURAN E, IRMAK S, ET AL. Comparison of several advanced oxidation processes for the decolorization of Reactive Red 120 azo dye in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials* 2004;109:85- 93
251. SCHIPPER H. Neurodegeneration with brain iron accumulation. Clinical syndromes and neuroimaging. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1822:350-60
252. Chambers, S. M. & Studer, L. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell* **145**, 827-830, doi:10.1016/j.cell.2011.05.036 (2011).
253. Park, I. H. *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**, 877-886, doi:10.1016/j.cell.2008.07.041 (2008).
254. Nityanandam, A. & Baldwin, K. K. Advances in reprogramming-based study of neurologic disorders. *Stem Cells Dev* **24**, 1265-1283, doi:10.1089/scd.2015.0044 (2015).
255. Kim, C. iPSC technology--Powerful hand for disease modeling and therapeutic screen. *BMB Rep* **48**, 256-265 (2015).
256. Kelaini, S., Cochrane, A. & Margariti, A. Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state. *Stem cells and cloning : advances and applications* **7**, 19-29, doi:10.2147/SCCAA.S38006 (2014).
257. Ambasudhan, R. *et al.* Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* **9**, 113-118, doi:10.1016/j.stem.2011.07.002 (2011).
258. Volz K (2008) The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 18:106-111.
259. Koh HJ, Lee SM, Son BG, Lee SH, Ryoo ZY, Chang KT, Park JW, Park DC, Song BJ, Veech RL, Song H, Huh TL (2004) Cytosolic NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem* 279:39968-39974.
260. Newton CL, Whay AM, McArdle CA, Zhang M, van Koppen CJ, van de Lagemaat R, Segaloff DL, Millar RP (2011) Rescue of expression and signaling of human luteinizing hormone G protein-coupled receptor

- mutants with an allosterically binding small-molecule agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7172-7176.
261. Goldin E, Zheng W, Motabar O, Southall N, Choi JH, Marugan J, Austin CP, Sidransky E (2012) High throughput screening for small molecule therapy for Gaucher disease using patient tissue as the source of mutant glucocerebrosidase. *PLoS One* 7:e29861.
 262. Andreotti G, Cabeza de Vaca I, Poziello A, Monti MC, Guallar V, Cubellis MV (2014) Conformational response to ligand binding in phosphomannomutase2: insights into inborn glycosylation disorder. *J Biol Chem* 289:34900-34910.
 263. Andreotti G, Guarracino MR, Cammisa M, Correra A, Cubellis MV (2010) Prediction of the responsiveness to pharmacological chaperones: lysosomal human alpha-galactosidase, a case of study. *Orphanet J Rare Dis* 5:36.
 264. Hay Mele B, Citro V, Andreotti G, Cubellis MV (2015) Drug repositioning can accelerate discovery of pharmacological chaperones. *Orphanet J Rare Dis* 10:55.
 265. Maitra R, Hamilton JW (2007) Altered biogenesis of deltaF508-CFTR following treatment with doxorubicin. *Cell Physiol Biochem* 20:465-472.
 266. Rigat B, Mahuran D (2009) Diltiazem, a L-type Ca(2+) channel blocker, also acts as a pharmacological chaperone in Gaucher patient cells. *Mol Genet Metab* 96:225-232.
 267. Bendikov-Bar I, Maor G, Filocamo M, Horowitz M (2013) Ambroxol as a pharmacological chaperone for mutant glucocerebrosidase. *Blood Cells Mol Dis* 50:141-145.
 268. Porto C, Ferrara MC, Meli M, Acampora E, Avolio V, Rosa M, Cobucci-Ponzano B, Colombo G, Moracci M, Andria G, Parenti G (2012) Pharmacological enhancement of alpha-glucosidase by the allosteric chaperone N-acetylcysteine. *Mol Ther* 20:2201-2211.
 269. Maegawa GH, Tropak M, Buttner J, Stockley T, Kok F, Clarke JT, Mahuran DJ (2007) Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *J Biol Chem* 282:9150-9161.

270. Martin GM, Chen PC, Devaraneni P, Shyng SL (2013) Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels. *Front Physiol* 4:386.
271. Ishihara K, Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, Kobayashi T, Usami S, Ikeda K, Haga Y, Tsumoto K, Nakamura H, Hirasawa N, Wada H (2010) Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. *Hear Res* 270:110-118.
272. Sharma LK, Subramanian C, Yung M, et al. A therapeutic approach to pantothenate kinase associated neurodegeneration. *Nat Commun*. 2018;9(1):4399. doi: 10.1038/s41467-018-06703-2
273. Strafella C, Caputo V, Galota MR, Zampatti S, Marella G, Mauriello S, Cascella R, Giardina E (2018) Application of precision medicine in neurodegenerative diseases. *Front Neurol* 9:701.
274. Tan L, Jiang T, Tan L, Yu JT (2016) Toward precision medicine in neurological diseases. *Ann Transl Med* 4:104.
275. Tello C, Darling A, Lupo V, Perez-Duenas B, Espinos C (2018) On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Clin Genet* 93:731-740.
276. Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63:287-303.
277. Titova N, Chaudhuri KR (2017) Personalized medicine in Parkinson's disease: Time to be precise. *Mov Disord* 32:1147-1154.
278. <https://www.lifeder.com/barrera-hematoencefalica/>
279. Ingrassia R, Memo M, Garavaglia B (2017) Ferrous iron up-regulation in fibroblasts of patients with beta propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). *Front Genet* 8:18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00018>
280. Levi S, Tiranti V. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders: Valuable Models Aimed at Understanding the Pathogenesis of Iron Deposition. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019;12(1):27. Published 2019 Feb 9. doi:10.3390/ph12010027

APÉNDICE

A.1. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura I1: Absorción, transporte, almacenamiento y reutilización del hierro en seres humanos.

Figura I2: Resumen del metabolismo del hierro y su función celular.

Figura I3: Esquema barrera hematoencefálica.

Figura I4: Mecanismo del hierro a través de la barrera hematoencefálica.

Figura I5: Metabolismo del hierro en el cerebro.

Figura I6: Distribución prevalencia ENACH.

Figura I7: Cronología esquemática que ilustra los descubrimientos importantes en el campo NACH relacionados con la desregulación mitocondrial.

Figura I8: Representación esquemática de genes, vías y mecanismos fisiopatológicos de NACH.

Figura I9a: Esquema ilustrativo de la ruta de síntesis de CoA.

Figura I9b: Diferentes funciones que está involucrada en CoA

Figura I10: Patrón específico del “ojo de tigre” mostrado en MRI de pacientes.

Figura I11: Estructura molecular del Coenzima A.

Figura I12: Primera reacción para la síntesis de CoA.

Figura I13: Segunda reacción para la síntesis de CoA.

Figura I14: Tercera reacción para la síntesis del CoA.

Figura I15: Cuarta reacción para la síntesis del CoA.

Figura I16: Quinta reacción para la síntesis del CoA.

Figura I17: Estructura molecular de la PANK2 unida a acetil CoA (derecha), estructura molecular de la PANK3 unida a acetil CoA.

Figura I18: Estructura molecular de la PANK1 unida a acetil CoA.

Figura I19: Resumen de las principales estrategias terapéuticas que se emplean para la reprogramación celular y sus aplicaciones.

Figura R1a: Niveles de proteína total PANK1, PANK2 y PANK3 en fibroblastos PKAN.

Figura R1b: Representación gráfica de la densitometría de PANK1, PANK2 y PANK2 referidas a fibroblastos control.

Figura R2a: Imágenes de la morfología celular de fibroblastos control y fibroblastos PKAN en microscopía de campo claro.

Figura R2b: Representación gráfica del perímetro celular en fibroblastos control y fibroblastos PKAN usando el programa Image J.

Figura R2c: Imágenes de la tinción de Azul de Prusia en placas de 6 pocillos de tres líneas de fibroblastos control y tres líneas de fibroblastos PKAN.

Figura R2d: Imágenes de la tinción de Azul de Prusia de fibroblastos control, fibroblastos PKAN, fibroblastos PKAN tratados con deferiprona y fibroblastos portadores de mutación MERRF.

Figura R2e: Representación gráfica de la acumulación de hierro de células control, células PKAN, células PKAN tratadas con deferiprona y células MERRF, usando el programa Image J.

Figura R2f: Determinación del contenido de hierro mediante la técnica de la Ferrozina en fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Figura R2g: Imágenes de autofluorescencia celular en fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Figura R2h: Imágenes de microscopía en campo claro de la tinción de Sudan Black (Negro Sudán) para ver la acumulación de lipofuscina en fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Figura R2i: Imágenes de microscopía electrónica para ver los gránulos de lipofuscina tanto en células control como fibroblastos PKAN.

Figura R2j: Representación gráfica del análisis de autofluorescencia en células control y células PKAN usando el programa Image J.

Figura R2k: Representación gráfica de la tinción negro Sudan en fibroblastos control y fibroblastos PKAN usando el programa Image J.

Figura R2l: Cuantificación de los granulos de lipofuscina de las imágenes de microscopía de fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Figura R2m: Imágenes de autofluorescencia de fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con deferiprona a 100 μ M y sin tratar.

Figura R2n: Representación gráfica de la cuantificación de la autofluorescencia por el programa Image J en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con deferiprona a 100 μ M y sin tratar.

Figura R2o: Representación de los espectros de autofluorescencia de los gránulos de lipofuscina medidos por microscopía láser de escaneo en

fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con deferiprona a 100 μ M y sin tratar.

Figura R2p: Microscopía electrónica de barrido con espectrofotometría de rayos X y energía dispersa (SEM/EDX) de gránulos de lipofuscina aislados.

Figura R3a: Imágenes de células control y células PKAN tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M.

Figura R3b: Representación gráfica del análisis de cuantificación de células control y células PKAN tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M usando el programa Image J.

Figura R3c: Representación gráfica de la cuantificación de la tinción de Azul de Prusia en células control y células PKAN a diferentes concentraciones de pantotenato (50 μ M - 500 μ M) durante 3 – 20 días.

Figura R3d: Representación gráfica del hierro en células control y células PKAN tratadas con pantotenato a 500 μ M y sin tratar, analizado mediante Ferrozina.

Figura R3e: Representación gráfica del hierro total analizado por ICP-MS en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3f: Representación gráfica del efecto del tratamiento de pantotenato sódico a 500 μ M en fibroblastos PKAN respondedores.

Figura R3g: Representación gráfica del perímetro celular de fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3h: Imágenes de autofluorescencia celular en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3i: Representación gráfica de la cuantificación de autofluorescencia en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3j: Imágenes de Negro Sudán de fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3k: Representación gráfica de la tinción de Negro Sudán analizado por Image J, de fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R3m: Representación gráfica de los gránulos de lipofuscina analizados por microscopía electrónica tanto en fibroblatos control como fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R4a: Estrés oxidativo en fibroblastos PKAN. Estudio de proteínas carboniladas en células control y células PKAN mediante ensayo OXYBLOT.

Figura R4b: Representación gráfica de la cuantificación de OXYBLOT, usando el programa Image J.

Figura R4c: Representación gráfica de la peroxidación lipídica mitocondrial evaluada mediante MitoPeDPP en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R4d: Imágenes representativas de la técnica MitoPeDPP en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R4e: Imágenes representativas de fibroblastos control y fibroblastos PKAN con MitoPeDPP y Mitotracker para ver colocalización.

Figura R5a: Análisis bioenergético de fibroblastos control y fibroblastos PKAN tras tratamiento con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R5b: Imágenes de fluorescencia de células control y células PKAN donde se muestra la fragmentación mitocondrial de los fibroblastos sin tratar y posterior recuperación de la red mitocondrial tras ser tratadas con pantotenato a 500 μ M.

Figura R5c: Representación gráfica de la fragmentación mitocondrial.

Figura R5d: Imagen que muestra la ampliación de la fragmentación mitocondrial en fibroblastos PKAN sin tratar y su posterior restauración de los fibroblastos PKAN tras el tratamiento con pantotenato a 500 μ M.

Figura R6a: Representación grafica del ensayo de muerte celular usando rotenona a 100 μ M en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R6b: Representación gráfica del ensayo de muerte celular usando cloruro de hierro a 500 μ M en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R7a: Estabilización de la proteína PANK2. Ensayo de inmunotransferencia en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con

pantotenato a 500 μ M y sin tratar. Se midió los niveles de PANK2, PANK1 y PANK3.

Figura R7b: Representación gráfica de los niveles de CoA mitocondrial analizados por HPLC, en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R8a: Estudio de los niveles de proteína total involucradas en el metabolismo del hierro, tanto en fibroblastos control como en fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R8b: Representación gráfica de la medición de LIP (labil iron pool) en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R8c: Representación gráfica de la cantidad de grupo hemo en fibroblastos control y fibroblastos PKAN tratados con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura R9a: Generación de neuronas inducidas a partir de fibroblastos control y fibroblastos PKAN. Imágenes de microscopia de inmunofluorescencia usando marcadores neuronales MAP2/TAU.

Figura R9b: Representación gráfica de la eficiencia de conversión y pureza neuronal de neuronas inducidas desde fibroblastos control y fibroblastos PKAN.

Figura R10a: Tinción Azul de Prusia de neuronas control y neuronas PKAN tratadas con pantotenato sódico a 500 μ M y sin tratar.

Figura R10b: Inmunotinción con TAU, marcador neuronal en neuronas control y neuronas PKAN tratadas con pantotenato a 500 μ M y sin tratar. Tinción Azul de Prusia de las neuronas tras inmunotinción con marcadores neuronales.

Figura R10c: Representación gráfica de la tinción Azul de Prusia de las neuronas inducidas desde fibroblastos control y fibroblastos PKAN, tratadas con pantotenato a 500 μ M y sin tratar.

Figura D1: Esquema representativo de la ruta del Coenzima A, actuando como sustrato el pantotenato sódico sobre la enzima PANK2.

Figura D2: Alteración del metabolismo del hierro en células PKAN.

Figura D3: Modelo de enfermedad y estrategia de detección de fármacos en PKAN.

TABLAS

Tabla I1: Tipos de neurodegeneraciones con el tipo de herencia mendeliana, gen mutado y localización cromosómica que presenta cada una de ellas.

Tabla I2: Esquema de los diferentes subtipos NACH que presentan disfunción mitocondrial.

Tabla I3: Localización de las mutaciones causantes de PKAN en cDNA de PANK2.

Tabla I4: Resumen de las ventajas de la reprogramación Vs iPSC.

Tabla R1a: Cuantificación del espectro por EDX.

Tabla R1b: Análisis cuantitativo del espectro EDX de cuatro granulos de lipofuscina aislados.

A.2. Agradecimientos

Pensé que nunca iba a llegar este momento, el momento de hacer un sueño realidad, y llegar a ser Doctora. Una etapa que he vivido con muchísimas emociones, con miedos, alegrías, satisfacciones, pero sobre todo con ilusión y optimismo. Nunca olvidaré el día que llegué a este laboratorio, donde me recibieron con los brazos abiertos y una sonrisa, y eso hay que decirlo, que es de agradecer, porque cuando menos te lo esperas hay gente maravillosa a tu lado que está apoyándote para hacer tus sueños realidad.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. José Antonio Sánchez Alcázar. Gracias por toda la confianza depositada en mí para formar parte de este proyecto, por darme seguridad y confianza en mi misma, por abrirme las puertas del grupo y hacerme sentir una más cuando más lo necesitaba. Gracias José Antonio por ayudarme a crecer, no solo en lo profesional, sino también en lo personal, y darme cuenta qué quiero en mi vida y por lo que quiero luchar. Hay personas que restan en la vida y otras que por suerte ayudan a sumar y seguir creciendo. José Antonio, tú has sido una pieza clave en este puzzle para seguir avanzando. Solo puedo decirte; GRACIAS.

Este sueño se hizo realidad gracias a una grandísima persona, que me ayudó a formar parte de la familia 210, y más que nunca tengo que agradecerse. Esta persona es David Cotán a quien yo cariñosamente llamo el Mr. Me has aportado tanto... no solo en el laboratorio, sino en todas las andaduras que hemos tenido juntos durante estos ya casi 10 años que nos conocemos. Gracias por abrirme las puertas del 210, sin ti esto no hubiera sido posible.

Gracias Marina, qué hubiera hecho yo sin ti.... Mi compañera de poyata, mi amiga, mi confidente, gracias por estar ahí cuando entraba en crisis “Drama Queen” y decirme: “Moni, tranquila, piensa....” Sin esas palabras mágicas no hubiera hecho nada, bueno, sí, hubiera volado el centro con una ultracentrífuga.

Gracias Marta, te debo tanto... En esta última etapa has sido fundamental para mí, sin ti muchas cosas no hubieran sido posibles. Tú siempre me tenías una

palabra que me tranquilizaba y me venía arriba, vales tanto... Eres y serás siempre mi popita favorita.

Gracias Alex, tu forma de ser tan optimista y de ver siempre las cosas con alegría ayudan muchísimo. Es increíble como dos personas tan diferentes pueden tener una conexión tan mágica, eres una tía 10.

A Juanmi, por toda su positividad y por estar siempre ahí cuando lo necesitaba. Tenemos que reconocer que poner a punto protocolos juntos se nos da bastante bien, gracias por tus revisiones y exigencias.

Irene y Suleva: gracias chicas por estar ahí dando ánimos, por vuestra profesionalidad y por enseñarnos a muchos de nosotros a trabajar con exigencia.

Nuestro Manu, nuestro pillín, como yo le digo. Eres un chico estupendo, alegre, positivo y siempre con la palabra acertada cuando menos te lo esperas. Gracias por ayudarme con el maravilloso mundo del Word... ya no te debo tantos coscos.

Hay muchísimas personas que desde el principio han estado en esta andadura conmigo y que por diversos motivos de la vida hemos cogido caminos diferentes. Gracias, Ana, por recibirme el primer día con una gran sonrisa y por enseñarme el mundo del HPLC, amado por un lado y odiado al mismo tiempo, pero siempre interesante. Gracias Raquel, quien comenzó conmigo esta aventura del mundo NACH, hicimos un gran equipo y creo que grandes cosas. A mi querida Lucía, mi pequeña, quien estaba siempre conmigo en los momentos de estrés, ayudándome con todo el trabajo y siempre diciéndome, "tú Mónica, no te preocupes que para eso estoy yo aquí". A Carmen, gracias por tus ganas de aprender cada día más, por tus ganas en cada una de las técnicas, siempre enfrentándote a ellas con ilusión; hicimos un buen equipo. A Ángeles, por tu serenidad y tu trabajo, ayudastes mucho a todo el equipo. A Bea por tus locuras y alegría, trabajadora como nadie.

Gracias a Mario por compartir tu experiencia y profesionalidad. Gracias Raquel, por tus consejos y tus ánimos, eres una luchadora innata, conseguirás tus metas y tus sueños se harán realidad.

Quiero dar las gracias también a todo el personal del CABD, sin vosotros y vuestros servicios ninguno de nosotros podría hacer su trabajo. Gracias a Vanesa, Alex, Jose, Pachú, al servicio de Cocinas y Limpieza, y en especial a Natalia y Fati por vuestra alegría a la hora de trabajar y siempre con una sonrisa. A Kathy y Corin, por su paciencia y ayuda en microscopía. A Laura, por tus consejos en proteómica, y evitar que más de uno nos chocásemos contra la pared en tu famoso kit reducción de estrés.

No me puedo olvidar de mis chicos de Pronacera. Mi cordobesa, mi Mari Paz: gracias por escucharme siempre, por compartir audios de WhatsApp interminables de 15 minutos donde nos contábamos nuestras cosas y siempre sacábamos lo positivo. Eres una persona que suma en todos los aspectos, nunca lo olvides, eres maravillosa. A mi argentino lindo, Leo, gracias por los buenos consejos y tu frase mágica “Va, Moni”. Eres un chico estupendo, buen compañero y buen amigo. A Antonio, un chico exigente y trabajador como ninguno, gracias por tus consejos y tus ánimos.

No puedo olvidar a dos personas tan importantes en mi vida como son “Mis Ketchup”, Aída y Salud. Aída, gracias por ser como eres, esa sonrisa tan positiva, ese optimismo y tu forma de ver la vida hace que los demás nos contagiemos, y eso se agradece muchísimo. Salud, eres simplemente única, trabajadora, luchadora, y siempre con tu sonrisa en la boca, conseguirás tus sueños y esos abrazos que tanto esperas.

Durante mi vida profesional he tenido la suerte de conocer personas maravillosas que me han enseñado muchísimo del mundo de la ciencia y no puedo olvidarme de mi cubanita linda, mi Susy, una amiga, una hermana, siempre pendiente de mí, apoyándome para hacer realidad mi sueños.

Gracias a la asociación ENACH por permitirme formar parte de esta gran familia. Sin vuestra confianza esto no hubiera sido posible, nuestra lucha siempre será la misma... “Hay que quitarle el hierro al asunto”.

He tenido la suerte de conocer a grandes profesiones durante esta andadura como el Dr. Antonio Díaz Quintana (Universidad de Sevilla), el Dr. Isidoro Caraballo (Universidad de Sevilla), el Dr. Joaquin Salas (Instituto de la Grasa-CSIC y el Dr. José Ángel Armengol (Universidad Pablo de Olavide), que gracias a sus colaboraciones se ha conseguido los resultados esperados.

Gracias a mis cuñadas, Esther y Luisi, por estar siempre animándome y hacerme sonreír en momentos difíciles.

A mis suegros, Pepe y Pepi, que me han tratado siempre como una hija más, cuidándome y protegiéndome cuando me he sentido sola, porque a veces la distancia de no tener a tu familia cerca duele mucho y ellos siempre me han ayudado a hacerla más llevadera.

A mi tío Alfonso, gracias por tus consejos, tus charlas, por escucharme siempre y preocuparte por mi. Nunca olvidaré una frase: “El que espera y no desespera se lleva la mejor pera”, sin duda, yo me la llevé.

A mi hermana, dos personas tan diferentes pero que nos une un único corazón. A mi cuñado Juan Carlos, mi hermano mayor, un ejemplo a seguir en luchador y trabajador como nadie. A mi niño, mi Juan Carlillos, mi sobrino, la alegría de nuestra familia, gracias por estar siempre ahí cuidándome tanto.

Mi Escobar, que hubiera hecho yo sin él, mi marido, mi compañero de vida, mi amigo, mi otra mitad, siempre apoyándome y dándome los mejores consejos para seguir luchando. Hemos pasado momentos difíciles pero siempre lo hemos solventado estando juntos. Gracias por darme ánimos y levantarme cuando me derrumbaba, con tus palabras y tu cariño todo sana. Solo te puedo decir que con ilusión y alegría todo se consigue y si caminamos juntos de la mano todo será más fácil y, por supuesto, siempre con nuestra Lola.

Estos últimos agradecimientos quizás para mí sean los más difíciles de escribir porque el sentimiento que arrastran es enorme. Mamá, qué puedo decirte, eres luchadora como nadie, has sacado adelante a dos hijas y siempre con una sonrisa, gracias por tu sacrificio y esfuerzo, por estar a mi lado, por consolarme,

por animarme, por ser el pilar de mi vida y por no dejarme caer. Sin ti este sueño hubiera sido imposible; hay palabras que levantan el alma y cuando tú me dices “Para arriba!!!” esa frase es como una inyección de adrenalina que me da la vida. Es increíble mamá que con todo lo que has sufrido siempre has tenido fuerzas para darme el apoyo que necesitaba. Eres mi ejemplo a seguir, GRACIAS MAMÁ.

Y por último, quiero terminar nombrando a una persona que para mí ha sido mi modelo a seguir durante toda mi vida, mi padre. Hace 19 años un cáncer nos lo arrebató de nuestro lado y tu ausencia no se supera. Solo espero que estés orgulloso de mí y quiero que sepas que para mí no hay mayor orgullo que llevar el apellido Álvarez y ser tu hija. TE QUIERO PAPÁ.



